



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di Laurea:

**STUDIO DEGLI INIBITORI COVALENTI DELLA
MONOACILGLICEROLO LIPASI**

Relatore: Dr. Tiziano Tuccinardi

Candidato: Michele Maggi

ANNO ACCADEMICO 2013-2014

Sommario

Introduzione.....	4
Principi attivi della Cannabis Sativa: i cannabinoidi esogeni	4
La scoperta del sistema endocannabinoide	5
Anandamide e 2-arachidonoilglicerolo: mediatori endocannabinoidi	7
La scoperta della monoacilglicerolo lipasi (MAGL)	8
Selettività della MAGL per il substrato	9
Localizzazione tissutale	9
Caratterizzazione della MAGL	10
Struttura tridimensionale della MAGL	13
Meccanismo catalitico	16
Potenzialità terapeutiche degli inibitori della MAGL	17
Ruolo nel cancro e sintomi ad esso correlati	17
Altre potenzialità terapeutiche	20
Ligandi covalenti delle cisteine	23
N-arachidonoil-maleimmide e derivati maleimmidici	25
Disulfiram e derivati bis(dialchilammino-tiocarbonil)disolfurici.....	28
Derivati isotiazolinonici.....	32
Inibitori covalenti della serina nucleofila	35
Derivati carbammici: da inibitori della FAAH ad una maggiore selettività verso la MAGL.....	37

CAY10499: un nuovo meccanismo d'azione su cui investigare	41
JZL184 come inibitore selettivo della MAGL.....	43
Esafluoroisopropanolo come gruppo uscente per una migliore selettività: composto KML29.....	46
Triazoluree piperaziniche/piperidiniche come inibitori ultra-potenti ed altamente selettivi della MAGL.....	48
Conclusioni:.....	53
Bibliografia.....	57

Introduzione

Principi attivi della Cannabis Sativa: i cannabinoidi esogeni

La Cannabis Sativa, detta anche canapa, è un genere di pianta a fiore appartenente alla famiglia delle Cannabaceae (o Cannabinaceae) originaria dell'Asia centrale.

È una pianta a ciclo annuale la cui altezza varia tra gli 1,5 e 2 metri (ma può comunque raggiungere altezze maggiori); ha un fusto eretto e ramificato con escrescenze resinose, le foglie sono composte da 5 a 13 foglioline lanceolate a margine dentato-seghettato e punte acuminate.

Salvo rari casi di ermafroditismo, le piante di canapa sono dioiche: i fiori delle piante maschili si presentano riunite in pannocchie terminali, mentre quelle femminili posseggono infiorescenze resinose simili a piccole spighe e localizzate alla base dei rami.

La cannabis è largamente utilizzata come fibra nell'industria tessile, come combustibile alternativo nel settore automobilistico e la ricerca scientifica è dedicata alla scoperta di tutte le sue possibili indicazioni terapeutiche.

Essa produce una serie esclusiva di composti, chiamati cannabinoidi, che se assunti provocano effetti fisiologici e/o psicotropi; i due più abbondanti sono il Δ^9 -tetraidrocannabinolo (THC), che è il più conosciuto e considerato capostipite della famiglia, ed il cannabidiolo (CBD) (vedi Figura 1).

Questi effetti sono molteplici: è possibile riscontrare secchezza delle fauci, arrossamento oculare, stimolazione dell'appetito, senso di gratificazione, riduzione della sensazione dolorifica e della nausea; tutti sono scaturiti dall'azione del THC, mentre il CBD non è psicotropo ma contribuisce a migliorare l'azione del THC, perché ne influenza positivamente la farmacocinetica e riduce gli effetti collaterali su respiro, frequenza cardiaca, temperatura e memoria.

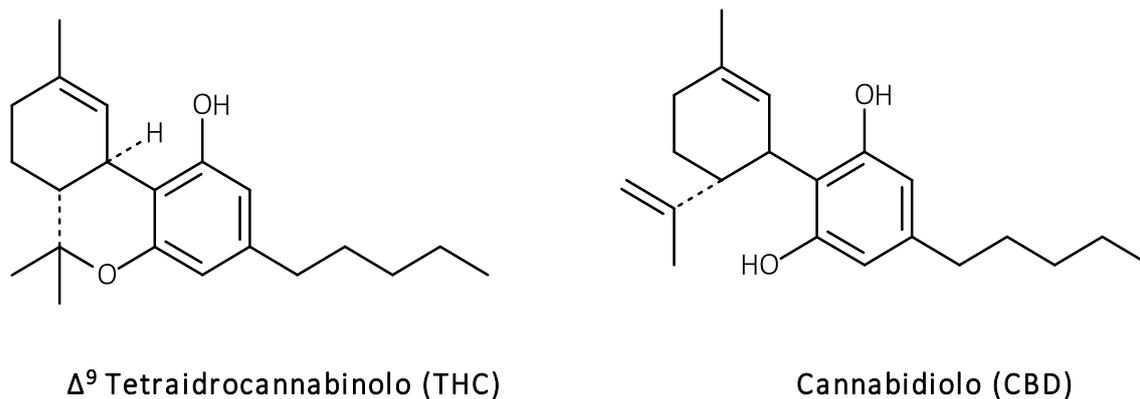


Figura 1 - Strutture chimiche dei cannabinoidi THC e CBD.

La scoperta del sistema endocannabinoide

Nel 1964 Mechoulam e Gaoni hanno messo in luce la struttura del THC (1) e la sua attività si è rivelata essere mediata da due specifici recettori detti CB1 (2) e CB2 (3), che appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine $G_{i/o}$ e sono costituiti da sette domini transmembranari.

Essi mediano diverse risposte cellulari, in particolare possono inibire l'adenilato ciclasi e la produzione di cAMP, possono inattivare la MAPK, la fosfolipasi C, la sfingomielinasi e la fosfoinositide 3-chinasi (PI3K).

I recettori CB1 sono espressi nel Sistema Nervoso Centrale (SNC) e in tessuti periferici, mentre i CB2 sono predominanti nelle cellule immunitarie; tuttavia sono stati individuati anche in diversi tessuti periferici, soprattutto in condizioni patologiche come il cancro, indipendentemente dal tessuto di origine, come accade nel glioma e nell'astrocitoma.

La funzione del sistema endocannabinoide (ECS) è quella di mediare l'adattamento dell'organismo a diversi stimoli e di regolare processi fisiologici fondamentali.

Recentemente, è stato visto che l'alterazione del ECS e/o la sovraespressione di recettori CB1 sono implicate in varie patologie come l'obesità, la sindrome metabolica, il diabete, l'Alzheimer. (4) (5).

Nel frattempo sono stati caratterizzati anche dei lipidi endogeni capaci di legare ed attivare questi recettori e di provocare effetti farmacologici simili a quelli dei cannabinoidi (sono stati definiti endocannabinoidi); stiamo parlando dell' N-arachidonoiletanolammide, o più semplicemente anandamide (AEA) (6), e del 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) (7) (8) (vedi Figura 2).

Altri endocannabinoidi che sono stati identificati, inclusa la virodamina e l'N-arachidonoildopamina (vedi Figura 2), derivano da un metabolismo non ossidativo dell'AA; alcuni esempi sono le N-aciletanolammidi palmitoiletanolammide, stearoiletanolammide, oleoiletanolammide, linoleoiletanolammide, eicosapentanoiletanolammide e docosaesanoiletanolammide.

Il profilo farmacologico di (endo)-cannabinoidi naturali e sintetici è stato ulteriormente esteso una volta che si è scoperta la loro capacità di interagire con recettori non CB, come il recettore orfano GPR55, i recettori canale potenziale-transienti (TRP), i canali ionici ligand-gated e il recettore nucleare attivante la proliferazione dei perossisomi (PPARs).

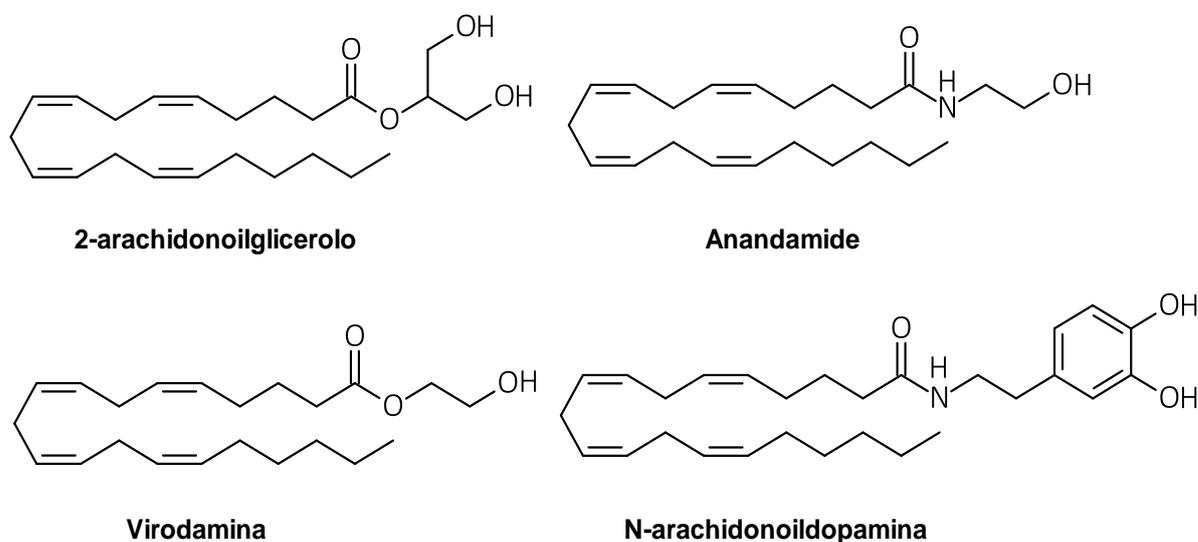


Figura 2 - Strutture chimiche dei principali endocannabinoidi.

Anandamide e 2-arachidonoilglicerolo: mediatori endocannabinoidi

L'anandamide appartiene al gruppo delle *N*-aciletanolammidi, è un endocannabinoide presente in grande quantità nel SNC e nel plasma, dove sembra svolgere anche un ruolo di tipo ormonale.

Viene sintetizzata per idrolisi enzimatica di un precursore_fosfolipidico, l'*N*-arachidonoil fosfatidiletanolamina (NArPE) e, dopo aver agito sui suoi recettori, viene idrolizzata per mezzo di una idrolasi intracellulare, la FAAH (Fatty Acid Amide Hydrolase), che porta alla formazione di acido arachidonico (AA) ed etanolamina (vedi Figura 3). (9)

Questo endocannabinoide, nel corso di studi scientifici su cavie (ratti e topi), ha mostrato di poter migliorare la capacità di lavoro della memoria (10), di essere coinvolto nel comportamento alimentare e negli stati di gratificazione e motivazione personale (11).

Il 2-arachidonoilglicerolo (2-AG) ha un presunto processo di sintesi che avviene attraverso l'idrolisi di fosfolipidi per mezzo della fosfolipasi C (PLC) β o δ ; l'enzima fosfolipasi rilascia diacilgliceroli (DAG) i quali vengono poi degradati ad opera della diacilglicerolo lipasi (DAGL) α o β .

La sintesi del 2-AG avviene nei neuroni postsinaptici, esso si va poi a legare ai recettori CB1 presinaptici per modulare il rilascio di neurotrasmettitori eccitatori o inibitori.

Esso è l'endocannabinoide riscontrato in quantità maggiore nei tessuti encefalici di ratto e topo (12) ed è stato trovato anche nel latte materno bovino e umano (13).

Il 2-AG è idrolizzato, principalmente, dalla monoacilglicerolo lipasi (MAGL) ad AA e glicerolo (vedi Figura 3), ma esistono anche altre idrolasi in grado di agire su di esso, come l' α/β idrolasi contenente un dominio 6 (ABHD6) e l' α/β idrolasi contenente un dominio 12 (ABHD12); pare che il 99% della quantità totale di 2-AG cerebrale sia idrolizzato dall'azione combinata di questi tre enzimi.

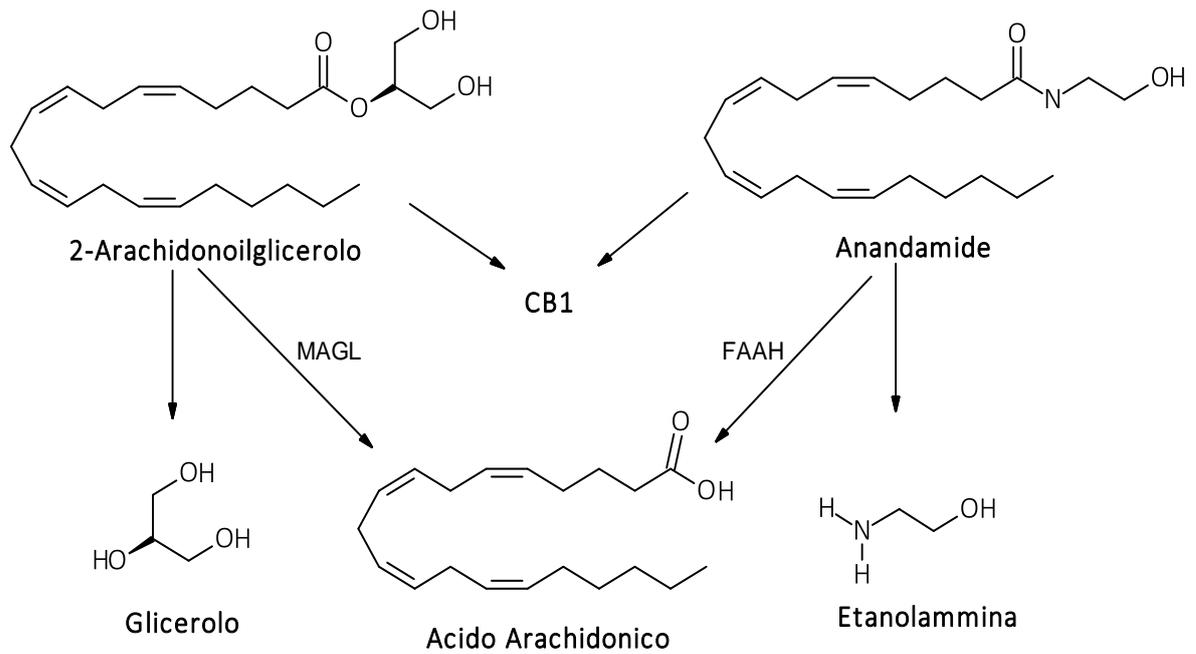


Figura 3 - Schema di degradazione di 2-AG e AEA, rispettivamente ad opera di MAGL e FAAH.

La scoperta della monoacilglicerolo lipasi (MAGL)

La scoperta di questo enzima, notoriamente deputato all'idrolisi del mediatore 2-AG, è avvenuta in un contesto estraneo a quello del sistema endocannabinoide. Tuttavia, è stato studiando i vari percorsi delle vie di mobilitazione dei grassi che la MAGL è stata portata alla luce.

Agli inizi degli anni sessanta, diversi studi hanno mostrato la presenza negli adipociti di due proteine coinvolte in processi lipolitici e diverse dalla nota lipoproteina-lipasi (14).

Una di queste si è rivelata essere l'ormone sensitivo lipasi (HSL), che all'inizio si pensava fosse il responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi a monoacilgliceroli.

In seguito a studi di immunoprecipitazione, i ruoli dei rispettivi enzimi sono stati chiariti ed è venuta fuori la presenza di un'ulteriore lipasi, denominata trigliceride lipasi del tessuto adiposo (ATGL) (15).

L'ATGL idrolizza i trigliceridi in diacilgliceroli, mentre l'HSL ha come preferenza quest'ultimi per poi formare monoacilgliceroli.

L'attività idrolitica specifica per i monogliceridi è stata notata nella porzione grassa del tessuto adiposo, co-localizzata insieme all'HSL; questa attività è lievemente preferenziale ai 2-monoleinici piuttosto che agli 1-monoleinici ed è gestita dalla MAGL (14).

Nel 1976 questo enzima è stato purificato a partire dal tessuto adiposo di 100 ratti, usando un detergente in grado di separarlo dai grossi aggregati contenenti lipidi (16).

Ci sono voluti poi altri anni perché si giungesse alla purificazione completa della proteina, sempre a partire da tessuto adiposo di ratto, che è stato espresso in linee cellulari fibroblastiche COS per ulteriori studi (17).

Selettività della MAGL per il substrato

La MAGL idrolizza efficientemente substrati con vario numero di doppi legami, da due a quattro, e con catene aciliche lunghe da otto a diciotto atomi di carbonio.

Ad ogni modo, il grado di insaturazione ha dimostrato di giocare un impatto certo sull'enzima; quest'ultimo infatti mostra preferenza per l'arachidonoilglicerolo, rispetto al palmitoilglicerolo ed in genere per i composti insaturi rispetto ai corrispettivi saturi (18).

Localizzazione tissutale

Fin dalla sua scoperta, la MAGL è stata subito riconosciuta essere un enzima espresso ubiquitariamente. Nel ratto sono stati ritrovati alti quantitativi dei relativi mRNA nel tessuto adiposo, rene e testicoli, ma anche nelle ghiandole surrenali, cervello, cuore, polmoni, muscoli scheletrici, fegato, ovaie e milza (17).

A sua volta il recettore è distribuito diversamente nelle varie aree encefaliche: corteccia, ippocampo, cervelletto, talamo ed in misura minore nel tronco encefalico ed ipotalamo.

Inoltre sono state riscontrate attività lipasiche ed immunoreattività, sia a livello citosolico che della membrana plasmatica (19); altre conferme sono arrivate mediante tecniche di proteomica funzionale, che hanno identificato l'enzima nei due compartimenti cellulari (20).

Tecniche di immunistochemica e microscopia ottica hanno, invece, permesso di studiare le distribuzioni cellulari della MAGL e della FAAH in varie zone encefaliche.

Nell'ippocampo, amigdala e cervelletto i due enzimi coesistono con il recettore CB1, secondo una distribuzione complementare: la MAGL si trova esclusivamente nella zona presinaptica degli interneuroni inibitori o eccitatori, mentre la FAAH è presente su dendriti e corpi neuronali, ma non sui terminali assonici. Inoltre la FAAH ha anche particolari preferenze per quanto riguarda la sua espressione: è localizzata infatti con la superficie citoplasmatica delle cisterne del reticolo endoplasmatico liscio e con altre membrane mitocondriali esterne, ma davvero raramente la si ritrova sulle membrane cellulari (21).

Questo conferisce alla MAGL una distribuzione molto più varia e non legata a preferenze compartimentali.

Caratterizzazione della MAGL

La proteina MAGL è un enzima solubile associato a membrana, la cui espressione è massima a livello del cervello, del tessuto adiposo e del fegato. Appartiene alla famiglia delle serina idrolasi e, come si è già visto, manifesta la sua attività in modo preferenziale sui monoacilgliceroli (piuttosto che diacil- o triacilgliceroli), che idrolizza per ottenere glicerolo ed acidi grassi. Uno di questi monogliceridi è l'endocannabinoide 2-AG, un ligando endogeno che interagisce con i recettori CB1 e CB2, entrambi appartenenti alla

classe di recettori accoppiati a proteine-G ed implicati nella risposta al Δ^9 -tetraidrocannabinolo.

La comprensione del ruolo metabolico, fisiologico e patologico della MAGL è stata fortemente accelerata negli ultimi anni dalla sintesi di efficaci inibitori *in vivo*, potenti e selettivi. Il blocco farmacologico della MAGL porta ad una notevole riduzione dell'idrolisi di 2-AG nel cervello (>80%), con un conseguente aumento dei livelli di quest'ultimo (19). Gli effetti farmacologici finali sono di tipo antinocicettivo e di ipomotilità, entrambi classicamente associati all'attivazione dei recettori CB1. Inoltre il blocco della MAGL mostra differenze specifiche nel metabolismo dei monoacilgliceroli nei vari tessuti: nel cervello si hanno notevoli aumenti di 2-AG, mentre nei tessuti periferici spesso si verificano grandi cambiamenti in altri monoacilgliceroli, in accordo con il ruolo lipolitico della MAGL, come risultato finale dell'idrolisi dei trigliceridi (22).

In aggiunta al ruolo di spegnimento del segnale del 2-AG, studi recenti hanno dimostrato che la MAGL rilascia amminoacidi, che costituiscono i precursori per la sintesi di prostaglandine pro-infiammatorie.

É stato visto che un blocco della MAGL porta ad un abbassamento del livello di amminoacidi nel cervello, in contrapposizione all'innalzamento del 2-AG, questo coincide anche con una riduzione della produzione di prostaglandine e trombossano (23).

Un blocco acuto della MAGL non porta ad un vero e proprio comportamento-cannabinoide analogo a quello che si osserva attraverso l'uso di agonisti cannabinoide diretti, i quali provocano catalessia e ipotermia; ciononostante un blocco acuto produce una modesta ipomotilità cannabinoide-mediata. Studi dimostrano che una cronica inibizione farmacologica conduce ad una perdita degli effetti cannabinoide-mediati con l'instaurazione di una tolleranza agli agonisti CB1; inoltre può insorgere una dipendenza fisica (24).

La MAGL è, inoltre, altamente espressa nelle cellule tumorali aggressive e nei tumori primari, dove regola i livelli di acidi grassi e delle molecole segnale protumorigeniche.

La sovraespressione di MAGL nelle cellule tumorali meno aggressive causa un aumento dei livelli di acidi grassi e promuove la proliferazione cellulare e la crescita tumorale *in vivo*. Al contrario, il trattamento con un inibitore o il silenziamento dell'enzima in cellule tumorali aggressive porta ad una riduzione dell'attività idrolitica sui monogliceridi, dei livelli di acidi grassi e conseguentemente della loro patogenicità (25).

L'analisi western-blot sull'enzima, estratto da diversi tessuti, ha rivelato la presenza di isoforme con distinti pesi molecolari, compresi fra 30kDa e 40kDa (26). È chiaro, quindi, come a seconda del tessuto e delle cellule in cui viene espressa, la MAGL possa avere un ruolo e una funzione diversa. A livello cerebrale essa controlla il segnale del 2-AG sul recettore CB1, nei tessuti periferici catalizza l'ultima fase della cascata che porta al rilascio di acidi grassi liberi a partire dalle riserve di trigliceridi; infine nelle cellule tumorali contribuisce al controllo dei livelli di acidi grassi liberi necessari per la sintesi dei messaggeri tumorali.

Struttura tridimensionale della MAGL

La MAGL fa parte della sottofamiglia delle lipide idrolasi, che a loro volta fanno parte delle α/β idrolasi.

Tutti questi enzimi condividono una struttura comune chiamata *ripiegamento delle α/β idrolasi*, costituita da otto foglietti- β affiancati su entrambi i lati da α -eliche (vedi Figura 4). Il ripiegamento è in grado di tollerare una vasta varietà di inserzioni, solitamente localizzate tra la catena β_6 e l'elica α_6 , utili a modificare e regolare l'attività catalitica della proteina senza perdere le peculiarità che caratterizzano la famiglia di enzimi.

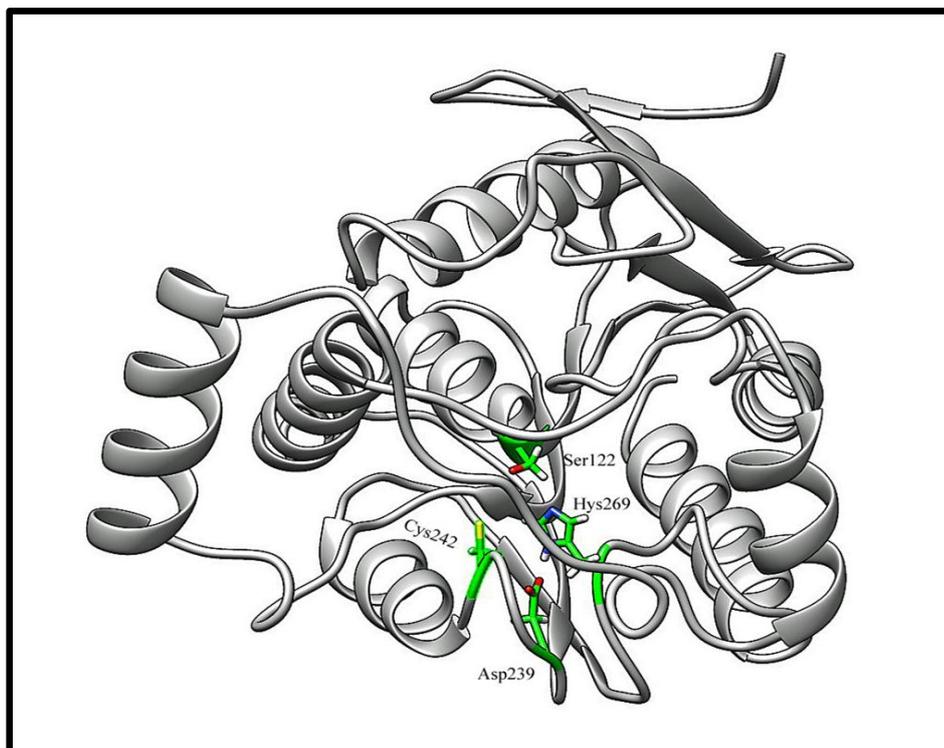


Figura 4 - Struttura della MAGL. Gli amminoacidi della triade catalitica sono colorati in verde, è indicata anche la cisteina 242.

La struttura della MAGL presenta un ripiegamento molto affine a quello canonico delle α/β idrolasi (17). Sono presenti, però, proprio nella porzione di sequenza più soggetta a variabilità, due eliche aggiuntive che costituiscono un “coperchio” a protezione

dell'accesso alla triade catalitica. Altre piccole idrolasi, a differenza della MAGL, hanno il sito catalitico esposto al solvente. La triade catalitica della MAGL, la cui sequenza è stata identificata come Ser122-His269-Asp239, è stata individuata attraverso mutagenesi sito-diretta su MAGL purificata di ratto, portando all'evidenza di come questi tre amminoacidi fossero essenziali per l'attività dell'enzima.

I tre residui amminoacidici giacciono sul fondo di una tasca a forma di tunnel (~25 Å in lunghezza e ~8 Å in larghezza) la cui entrata, esposta a solvente, è occupata dal dominio "coperchio". Il fondo del tunnel è occluso, mentre la porzione apicale presenta uno sbocco rivolto verso la regione occupata dal solvente. In prossimità del termine del canale e, quindi, della triade catalitica, vi è un piccolo foro, dal quale si suppone fuoriesca, in seguito all'idrolisi, il substrato endogeno (27). Nel complesso si può descrivere la tasca come un tunnel idrofobico largo e allungato con un'estremità polare, adatto ad accogliere molecole caratterizzate da lunghe catene alifatiche e testa polare, proprio come il ligando endogeno 2-AG.

Il tunnel si può ritrovare in due diversi stati, chiuso o aperto, a seconda della conformazione assunta dal dominio "coperchio". La forma chiusa di tale dominio è stata osservata in seguito a cristallizzazione con un inibitore reversibile dell'enzima (PDB ID: 3PE6), mentre la forma aperta è stata riportata in raggi X relativi all'enzima sia libero (PDB ID: 3HJU) che complessato con un inibitore irreversibile, il SAR629 (PDB ID: 3JWE).

Il dominio coperchio, che costituisce l'entrata nel sito attivo, è disposto come una grande struttura a forma di U, molto simile a quella più stretta, a forma di V, riscontrabile nella struttura di varie esterasi e nell'alooperossidasi (28). Uno dei bordi di questo ingresso è formato dall' α -elica 4, che è idrofobica e, insieme alla particolare forma del dominio coperchio, conferisce alla MAGL la capacità di ospitare substrati ingombranti e lipofili.

Lo studio della struttura dell'apoenzima e dell'enzima complessato con un inibitore ha permesso l'individuazione di diversi siti importanti nel legame con il 2-AG ed altri ligandi, come un ampio tunnel legante gruppi acilici e delimitato da numerosi residui idrofobici (cioè Leu148, Leu176, Ile179, Leu205, Val207, Leu213, Leu214, Val217 e Leu241), che formano varie tasche e, più in profondità nel sito catalitico, un'ulteriore tasca a carattere idrofilo delimitata dal gruppo ossidrile della Tyr58, la catena laterale di His121 e His272, la guanidina dell'Arg57, il carbossilato di Glu53 ed il gruppo carbonilico di Ala51. Tale tasca ospita la frazione di glicerolo nel legame con il 2-AG (27).

Sovrapponendo i raggi X della forma chiusa e della forma aperta, si può osservare che quasi esclusivamente il dominio "coperchio" e, in particolare, i residui 151-173, subiscono un riarrangiamento in seguito al legame con il ligando, mostrando quindi variazioni conformazionali significative. La transizione dalla forma aperta dell'enzima libero a quella chiusa dell'enzima complessato può essere descritta come un movimento rotazionale di circa 180° in senso antiorario dell' α -elica 4 attorno al sito attivo. L'effetto complessivo di questo avvolgimento verso l'interno è rappresentato da un accesso più ingombrato al sito attivo e dal blocco del composto all'interno della proteina. La piccola apertura localizzata nei pressi del sito attivo, che si è supposto fosse implicata nella fuoriuscita del substrato idrolizzato, è anch'essa completamente obliterata a causa del riarrangiamento strutturale.

Meccanismo catalitico

Il meccanismo catalitico della MAGL coinvolge una classica triade Ser-Asp-His (17). La nucleofilia della serina deriva dalla partecipazione alla triade catalitica. Il meccanismo catalitico procede attraverso la formazione di un intermedio acil-enzima in cui è implicata la serina del sito attivo, seguita da una saponificazione del prodotto indotta dall'acqua con rigenerazione del residuo libero di serina che può rientrare nel successivo ciclo catalitico (vedi Figura 5).

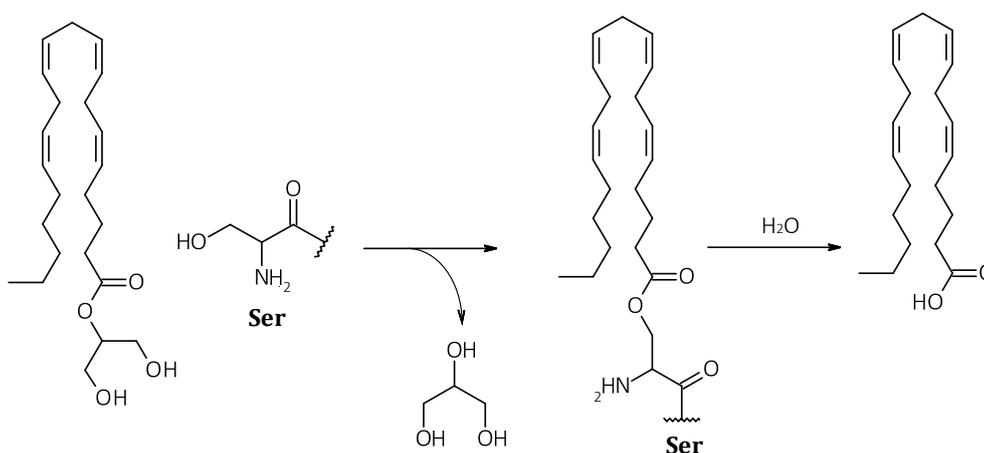


Figura 5 - Meccanismo catalitico.

Potenzialità terapeutiche degli inibitori della MAGL

L'utilizzo dei cannabinoidi e degli inibitori delle ciclossigenasi (COX1 e COX2) è stato da sempre finalizzato a trattare sintomi, quali dolore, infiammazioni, febbre, mancanza di appetito, convulsioni, depressione ed anche per esercitare un effetto protettivo nelle patologie neurodegenerative, come ictus e ischemie.

I cannabinoidi, tra cui il più conosciuto è il principio attivo della marijuana, agiscono sui loro recettori CB1 e CB2, esercitando effetti psicoattivi e cognitivi, ma anche terapeutici; i bloccanti della ciclossigenasi, di cui fanno parte i “*farmaci antinfiammatori non steroidei*” (FANS), impediscono la cascata dell'AA (un acido grasso derivante dall'idrolisi dei monoacilgliceroli) che porta alla sintesi di molecole pro-infiammatorie dette eicosanoidi.

Recenti studi hanno permesso di collegare la MAGL ad entrambi questi processi fisiologici, in quanto la sua inibizione evita la trasformazione del 2-AG in AA, rendendone i livelli particolarmente alti in determinati tessuti; questa situazione consentirebbe al 2-AG di stimolare i recettori cannabinoidi per produrre effetti anti-emetici, anti-nocicettivi ed ansiolitici (29).

Inoltre sembra che la MAGL, in condizioni di cancro aggressivo, favorisca la liberazione di acidi grassi liberi per la sintesi di lipidi pro-cancerogeni (30).

Ruolo nel cancro e sintomi ad esso correlati

Recentemente è stato dimostrato come la MAGL sia coinvolta nella patogenesi del cancro e la ricerca per la scoperta di nuove strategie terapeutiche basate sulla sua inibizione fa ben sperare (29).

La funzione del sistema endocannabinoide è essenziale in varie regioni del cervello incluso ipotalamo, cervelletto, ippocampo, striato, neocorteccia, dove il fine sembra essere quello

di provvedere a risposte protettive/omeostatiche allo stress e di regolare processi affettivi, cognitivi e motivazionali. Oltre che nel sistema nervoso centrale, è anche importante a livello periferico, dove controlla numerose funzioni biologiche come la nocicezione, il metabolismo, alcune funzionalità cardiovascolari e gastrointestinali e soprattutto la riproduzione cellulare.

Il segnale dei mediatori lipidici locali sembra giocare un ruolo importante in molte condizioni patologiche. Ad esempio la prostaglandina E2 (PGE₂), la sfingosina-1-fosfato (S1P) ed acido lisofosfatidico (LPA) inducono proliferazione e migrazione cellulare e favoriscono la crescita tumorale, l'angiogenesi e la metastasi in modelli animali di cancro (31). L'attivazione del recettore cannabinoide provoca l'effetto opposto nella maggior parte dei contesti cellulari (vedi Figura 6).

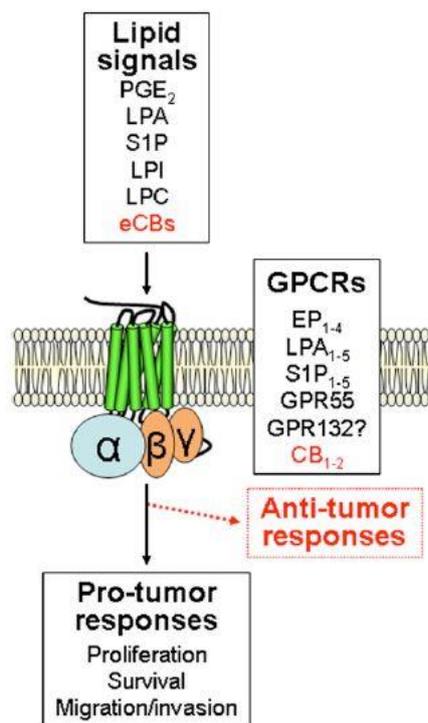


Figura 6 - Schema degli effetti dei mediatori lipidici locali nella crescita tumorale, via GPCRs.

Inoltre gli agonisti cannabinoidi sono ampiamente usati per alleviare le sensazioni di dolore, nausea e mancanza di appetito derivanti dalla chemioterapia.

La MAGL, oltre a mediare il segnale endocannabinoide del 2-AG, è coinvolta nella distruzione delle riserve adipose di triacilgliceroli, in modo da garantire ai tessuti il fabbisogno di acidi grassi liberi; quindi assume un ruolo delicato nell'omeostasi metabolica in particolare nei periodi di carenza di glucosio (16).

L'interesse della MAGL come target farmacologico è basato proprio sul controllo del rilascio delle riserve di acidi grassi, che sono necessari per la produzione dei segnali lipidici pro-cancerosi e sull'inibizione dell'idrolisi del 2-AG.

L'aumento degli acidi grassi sembra contribuire alla crescita tumorale attraverso più meccanismi, come la generazione di substrati energetici e la costruzione dei precursori di membrane cellulari o di lipidi oncogenici. Appena sintetizzati gli acidi grassi sono rapidamente incorporati nelle riserve lipidiche cellulari e si pensa che le cellule cancerose possano possedere una via lipolitica alternativa, atta a sfruttare la struttura acilica di queste riserve per generare molecole segnale (32).

E' stato notato, attraverso un approccio proteomico, che tra le molte serina idrolasi, prese in considerazione, la MAGL risulta altamente espressa in linee cellulari aggressive piuttosto che non aggressive, occupandosi della massiccia deplezione di monoacilgliceroli, per incrementare il livelli di acidi grassi liberi nelle cellule aggressive (33).

Il blocco genetico o farmacologico di MAGL in cellule aggressive le renderebbe meno ricche in acidi grassi e meno maligne, mentre l'espressione ectopica di MAGL in cellule non aggressive le arricchisce in acidi grassi e le rende più maligne.

La MAGL supporterebbe, quindi, le proprietà maligne delle cellule cancerose, mantenendo elevati i livelli di acidi grassi, a loro volta implicati nella produzione di vari messaggeri, come PGE2 e LPA, piuttosto che nella β -ossidazione, nella glicolisi, o nella generazione di membrane lipidiche, almeno nelle cellule testate.

Altre potenzialità terapeutiche

Oltre alle possibili applicazioni nel campo oncologico, esistono altre categorie di disagi che potrebbero giovare da un blocco selettivo della MAGL, mediante l'implicazione indiretta del sistema endocannabinoide e non, ossia:

- ✓ Dolore e infiammazione
- ✓ Malattie neurodegenerative
- ✓ Ansia
- ✓ Dipendenza da sostanze d'abuso

Oltre che per trattare dolore, spasticità, nausea e anoressia, gli agonisti dei recettori endocannabinoidi sono usati per ottenere un'azione anti-nocicettiva ed anti-infiammatoria (34). I FANS, come l'aspirina o l'ibuprofene, sono a loro volta ampiamente usati nel trattamento di dolore, febbre e infiammazione. Essi agiscono attraverso il blocco delle cicloossigenasi 1 e 2, con conseguente riduzione dei livelli di prostaglandine e trombossani responsabili dell'infiammazione (35).

La MAGL, a sua volta, controlla la formazione dell'acido arachidonico, molecola precursore proprio nella produzione di prostaglandine e trombossani, portando quindi al medesimo effetto antinfiammatorio.

Inoltre, dato il ruolo di controllo sull'endocannabinoide 2-AG, il blocco della MAGL si accompagna ad un effetto antinocicettivo CB1 dipendente (36).

Oltre alle implicazioni nella nocicezione e nel cancro, la MAGL è ora considerata coinvolta in più malattie neurodegenerative come il Parkinson, l'Alzheimer, la sclerosi multipla e l'ictus. Sia gli agonisti al recettore cannabinoide che gli inibitori COX hanno mostrato benefici di tipo protettivo o palliativo verso le malattie degenerative. Gli agonisti selettivi CB2 e non selettivi CB1/CB2 mostrano, in modelli animali di Parkinson,

un'azione che incrementa la sopravvivenza di neuroni e fibre dopaminergiche, riduce la deplezione di dopamina nella substantia nigra e aumenta l'attività della NADPH ossidasi verso le riduzioni (37); anche il blocco delle ciclossigenasi, nel caso di cavie trattate con MTPT (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina) che provoca una forma reversibile di Parkinson, previene la degenerazione dopaminergica, diminuisce lo stress ossidativo ed inoltre migliora il movimento (38).

E' stato sperimentato che in un modello di topo, a cui è stato provocato l'Alzheimer, gli agonisti del recettore cannabinoide riducono l'attivazione microgliale, i livelli di $TNF\alpha$, l'espressione di COX2 e i livelli di placche amiloidi β (39); le cavie trattate con FANS e quelle deficienti geneticamente di COX-1 hanno anche mostrato una riduzione della neuroinfiammazione, con miglioramenti dello stato cognitivo e del deficit di memoria (40). Gli inibitori della MAGL esibiscono effetti antinocicettivi ed antiinfiammatori, attraverso la simultanea attivazione del sistema endocannabinoide e la soppressione dei livelli di eicosanoidi nel cervello. Poiché il blocco cronico di MAGL pare porti alla desensitizzazione funzionale del sistema endocannabinoide, l'attività antineuroinfiammatoria finale sembra essere dovuta esclusivamente al blocco della sintesi degli eicosanoidi (23).

La MAGL sembra avere inoltre una possibile applicazione nel trattamento dell'ansia. Il blocco della MAGL previene lo stress cronico indotto e la depressione legata alla trasmissione GABAergica, ciò indica che l'aumentato segnale endocannabinoide previene comportamenti e adattamenti sinaptici allo stress cronico che porterebbero allo sviluppo di peggioramenti nei disordini affettivi (41). Cavie ansiose, trattate con inibitori MAGL, mostrano risposte positive CB1-mediate nei test di "murple burying", in cui il livello di ansia è direttamente proporzionale con la tendenza del roditore a sotterrare delle biglie; tutto ciò a dosi che non influenzano la capacità motoria (42).

Complessivamente gli inibitori MAGL promettono una riduzione dell'ansia.

È stato anche provato come il sistema endocannabinoide moduli la dipendenza da varie sostanze. Sia l'agonista del recettore cannabinoide Δ^9 -tetraidrocannabinolo che il blocco della MAGL riducono l'intensità dell'astinenza da morfina nel topo, in maniera CB1 dipendente (43). Dietro i comportamenti finalizzati alla ricerca di droga sembra esserci un potenziale meccanismo cellulare interconnesso tra sistema cannabinoide, dopaminergico e glutammatergico (44). Inoltre cavie dipendenti da nicotina, trattate con inibitori selettivi della MAGL, hanno mostrato una riduzione dose-dipendente dei sintomi di astinenza che è stata contrastata dagli antagonisti dei recettori cannabinoidi, come il Rimonabant (45).

Nel complesso, gli inibitori MAGL potrebbero essere utili per modulare la dipendenza da oppiacei e THC.

Ligandi covalenti delle cisteine

La tecnica del “modelling per omologia” permette di costruire la sequenza amminoacidica di una proteina ignota, basandosi su un template (molecola di riferimento) con il quale condivide una buona percentuale di omologia; nel caso della MAGL, i primi studiosi hanno scelto come template la Cloroperossidasi L, estratta da *Streptomyces lividans*.

E' risultato che ci sono sei residui cisteinici nel corredo genico della MAGL di ratto e topo, quattro dei quali si ripetono nella proteina umana: Cys32, Cys201, Cys208 e Cys 242 (vedi Figura 7) (46).

```

M 1  MPEASSPRRT PQNVFYQDLP HLVNADGQYL FCRYWKPSGT PKALIFVSHG AGEHCGRYDE
R 1  MPEASSPRRT PQNVFYQDLP HLVNADGQYL FCRYWKPSGT PKALIFVSHG AGEHCGRYDE
H 1  MPEESSPRRT PQSIPYQDLP HLVNADGQYL FCRYWKPTGT PKALIFVSHG AGEHSGRYEE

M 61  LAHMLKGLDM LVFAHDHVGH GQSEGERMVV SDFQVFVRDV LQHVDTIQKD YPDVPIFLLG
R 61  LAQMLKRLDM LVFAHDHVGH GQSEGERMVV SDFQVFVRDL LQHVNTVQKD YPEVPVFLLG
H 61  LARMLMGLDL LVFAHDHVGH GQSEGERMVV SDFHVFVRDV LQHVDSMQKD YPGLPVFLLG

M 121 HSMGGAISIL VAAERPTYFS GMVLISPLVL ANPESASTLK VLAAKLLNFV LPNMTLGRID
R 121 HSMGGAISIL AAAERPTHFS GMILISPLIL ANPESASTLK VLAAKLLNFV LPNISLGRID
H 121 HSMGGAIAIL TAAERPGHFA GMVLISPLVL ANPESATTFK VLAAKVLNLV LPNLSLGPID

M 181 SSVLSRNKSE VDLYNSDPLV CRAGLKVCFG IQLLNAVAV ERAMPRLTLP FLLLQGSADR
R 181 SSVLSRNKSE VDLYNSDPLI CHAGVKVCFG IQLLNAVSRV ERAMPRLTLP FLLLQGSADR
H 181 SSVLSRNKTE VDIYNSDPLI CRAGLKVCFG IQLLNAVSRV ERALPKLTVP FLLLQGSADR

M 241 LCDSKGAYLL MESSRSQDKT LKMYEGAYEV LHRELPEVTN SVLHEVNSWV SHRIAAAGAG
R 241 LCDSKGAYLL MESSPSQDKT LKMYEGAYEV LHKELPEVTN SVLHEINTWV SHRIAVAGAR
H 241 LCDSKGAYLL MELAKSQDKT LKIYEGAYEV LHKELPEVTN SVFHEINMWV SQTATAGTA

M 301 CPP
R 301 CLP
H 301 SPP

```

Figura 7 - Allineamento delle sequenze amminoacidiche della MAGL di topo (M), ratto (R) e uomo (H). Le cisteine sono marcate in giallo, mentre la triade catalitica in verde; la marcatura magenta indica la presunta sequenza del dominio variabile, in riferimento a quella riscontrata nel template (Cloroperossidasi L, da *Streptomyces lividans*).

Il residuo Cys242 è localizzato in una regione che si conserva ed è molto vicino alla triade catalitica Ser122-His269-Asp239; anche il residuo Cys32 occupa una posizione abbastanza conservativa.

I residui Cys201 e Cys208 sono invece posizionati nella porzione genica variabile, dalla quale è probabile che possano estendere i loro gruppi sulfidrilici verso il sito legante il substrato.

Utilizzando la mutagenesi sito-specifica sono state generate varie MAGL mutanti in cui ognuna delle quattro cisteine è stata rimpiazzata da una glicina (47); si è visto che la variante C242G (Gly242 al posto di Cys242) porta ad una notevole riduzione dell'attività basale dell'enzima, mentre C201G e C208G (Gly201 e Gly208 al posto di Cys201 e Cys208, rispettivamente) esibiscono anch'esse un abbassamento di quest'ultima, ma non così drastico come C242G.

Al contrario, nella variante C32G (Gly32 al posto di Cys32) non si riscontrano cambiamenti.

Questi risultati indicano che i residui cisteinici, vicini alla triade catalitica, giocano un importante ruolo funzionale e possono essere prese come target per ottenere inibitori altamente selettivi.

Inoltre i primissimi studi hanno dimostrato come la MAGL fosse suscettibile ad inibizione da parte di tre composti molto reattivi verso i gruppi tiolici: cloruro mercurico (HgCl_2), acido *p*-cloromeruribenzoico (*p*-CMB) ed N-etil-maleimide (NEM) (vedi Figura 8) (48).

In base a queste evidenze, negli ultimi anni, sono stati introdotti dei validi inibitori che hanno come bersaglio proprio i residui di cisteina.

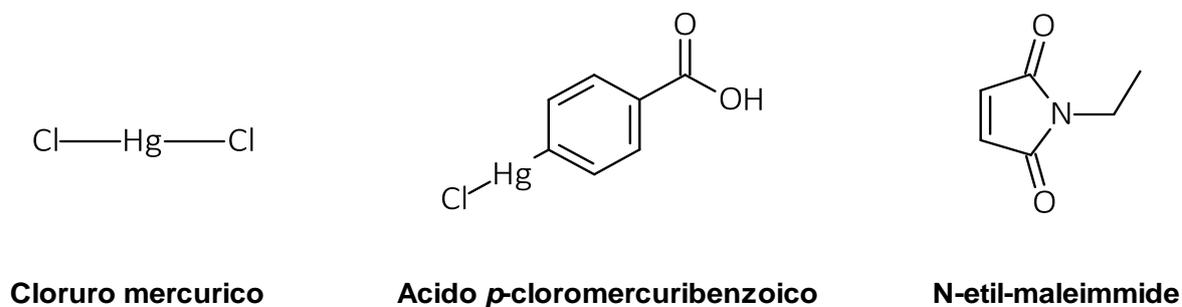


Figura 7 - Strutture chimiche di HgCl_2 , *p*-CMB e NEM.

N-arachidonoil-maleimmide e derivati maleimmidici

Come già specificato, i primi studi hanno indicato come la MAGL sia suscettibile ad inibizione da parte di tre composti specifici: acido *p*-cloromercuribenzoico, cloruro mercurico e NEM.

Il NEM possiede un gruppo immidico N-etilsostituito e un doppio legame molto reattivo verso i gruppi sulfidrilici delle proteine; recentemente gli studi sono stati focalizzati a chiarire il suo preciso meccanismo d'azione e a valutare quale tipo di sostituito sull'azoto immidico conferisse migliore specificità nei confronti di altri enzimi, come ad esempio la FAAH.

Il derivato più potente di questa classe è risultato essere l'*N*-arachidonoil-maleimmide (**1**) (vedi Figura 9 e Tabella 1) (49), che differisce dal NEM per il sostituito sull'azoto immidico: in questo caso una catena parzialmente insatura a 20 atomi di carbonio.

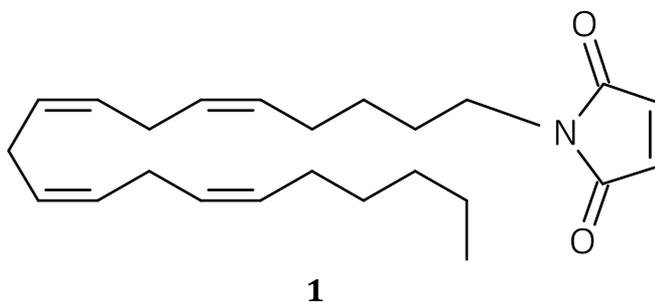


Figura 8 - Struttura chimica dell'*N*-arachidonoil-maleimmide (**1**).

Sono inoltre stati valutati altri derivati i quali, negli studi *in vitro* eseguiti su omogenati di tessuto cerebrale di ratto, hanno mostrato potenze simili o significativamente diverse (vedi Tabella 1); alcuni di questi sono: *N*-propil-maleimmide (NPrM) (**2**), *N*-fenil-maleimmide (**3**) (NPhM), *N*-cicloesil-maleimmide (**4**) (NCM), *N*-idrossil-maleimmide (**5**) (NHM), *N*-1piren-maleimmide (**6**) (NPyrM) ed *N*-arachidonoil-succinimmide (**7**) (NAS) (50).

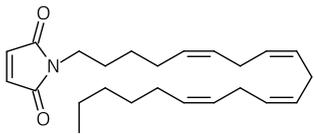
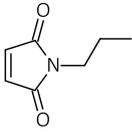
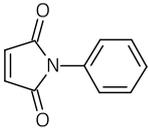
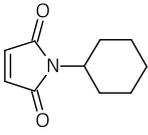
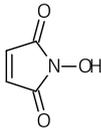
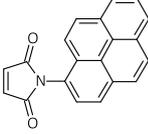
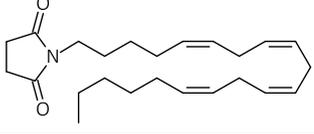
#	Nome	Struttura	MAGL, IC ₅₀ (μM)
1	NAM		0,14
2	NPrM		53
3	NPhM		44
4	NCM		51
5	NHM		413
6	NPyrM		9,2
7	NAS		> 500

Tabella 1 - Derivati maleimmidici N-alchil/aril sostituiti e relative IC₅₀

Come possiamo notare dalle varie IC₅₀ la potenza migliora quando i sostituenti sull'azoto sono più lipofili, decade di gran lunga quando questi sono fortemente idrofili (nel caso di 5) e non è presente per nulla quando viene a mancare il doppio legame endociclico (nel caso di 7).

La massima potenza è riscontrabile nel caso di 1, probabilmente perché la catena sull'azoto emula fortemente quella del substrato endogeno, il 2-AG appunto.

Somministrando invece *in vivo* una dose di **1** pari a 1 mg/kg, insieme a 2-AG esogeno, si riscontrano buona parte degli effetti dovuti alla diretta stimolazione dei recettori CB1: ipotermia, riduzione della capacità motoria e della sensazione dolorosa e catalessia (quest'ultima in forma minore). Questi possono significativamente, ma non completamente, essere contrastati dalla somministrazione di SR141716A un antagonista selettivo dei CB1, ma non dal SR144528 che antagonizza solo i CB2.

Gli effetti sopracitati sono riscontrati, in maniera molto minore però, anche in cavie deficienti di recettori CB1 trattate con **1** e 2-AG. Tutto ciò fa pensare che questo composto agisca attraverso meccanismi CB1 mediati, ma sicuramente è coinvolto anche in processi differenti.

Il composto **1** è risultato anche interagire direttamente con il recettore CB1, ma senza provocare attivazione della proteina G, bensì un'inattivazione; potrebbe dunque essere un antagonista di quest'ultimo.

Il meccanismo d'azione prevede che il doppio legame si comporti da accettore di Michael, legandosi all'enzima con formazione di un tioetere, ossia di un legame molto forte e praticamente irreversibile (vedi Figura 10). La mutagenesi sito-specifica ha identificato Cys201 e Cys242 come possibili residui dell'enzima su cui avviene l'attacco dell'inibitore.

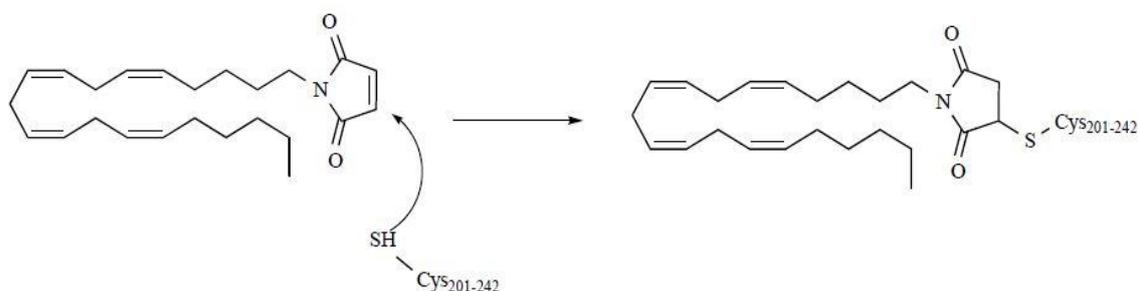


Figura 9 - Meccanismo d'azione del NAM (1).

Di sicuro lo scaffold maleimmidico N-sostituito può costituire un'ottima base per la scoperta e lo studio di altri derivati ad azione sempre più selettiva verso la MAGL.

Disulfiram e derivati bis(dialchilammino-tiocarbonil)disolfurici

Lo scaffold è caratterizzato dalla presenza di un legame disolfuro e di un gruppo tiocarbonilico.

Il team di Labar ha deciso di valutarne il potere inibitore, basandosi sui precedenti studi relativi ai derivati maleimmidici, che avevano suggerito la presenza di residui cisteinici nelle vicinanze del sito attivo della MAGL, in grado di riconoscere e legare il substrato.

Il composto principale di questa classe è il famoso principio attivo Disulfiram (**8**) (vedi Figura 10) (51); sono stati poi testati diversi derivati per trovarne di più potenti e per cercare di chiarirne il meccanismo di azione (52).

La molecola **8** è un farmaco usato da tempo per trattare l'alcolismo; il suo meccanismo d'azione è mediato dal blocco irreversibile dell'aldeide deidrogenasi (ALDH), un enzima chiave nel processo di metabolismo dell'etanolo, che porta all'accumulo di acetaldeide nel sangue e alla comparsa di sintomi spiacevoli, quali palpitazioni e cefalea.

La potenza inibitoria verso la MAGL umana mostra un IC_{50} pari a 1,26 μM , mentre verso la FAAH umana di 360 μM ; l'inibizione è di tipo irreversibile.

Il derivato più attivo di questa classe è il Bis(4-metil-1-piperaziniltiocarbonil)disolfuro (**9**) (vedi Figura 11), la cui IC_{50} è di 0,11 μM ed ha una selettività oltre 1000 volte maggiore per la MAGL rispetto alla FAAH.

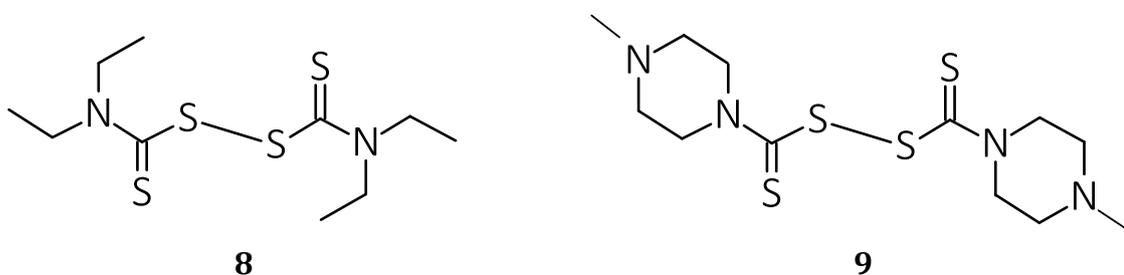
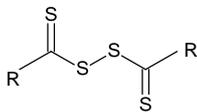
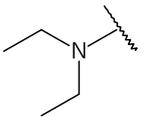
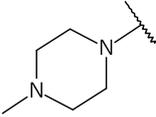
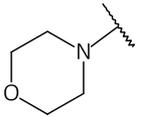
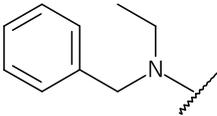


Figura 10 - Strutture chimiche del Disulfiram (**8**) e del Bis(4-metil-1-piperaziniltiocarbonil)disulfide (**9**).

I sostituenti ingombranti sull'azoto amminico portano a composti di scarsa attività (composto **13**, vedi Tabella 2) a causa di una sfavorevole accomodazione nel sito attivo dell'enzima e rendendo difficile l'interazione tra la porzione disulfidica e il residuo cisteinico. Infatti possiamo notare come, rendendo più rigido il gruppo etilico del composto **11** (vedi Tabella 2), si ottiene un netto miglioramento dell'attività (composto **12**, vedi Tabella 2).

Nel caso di ammine cicliche l'introduzione di un eteroatomo, ad esempio l'ossigeno (composto **10**, vedi Tabella 2), migliora l'attività ma soprattutto porta ad un aumento della selettività verso la MAGL rispetto alla FAAH.

Anche la porzione disolfurica e quella tiocarbonilica sono fondamentali; infatti i composti che deficitano anche di una sola di queste hanno mostrato una più scarsa attività.

		
#	R	MAGL, IC ₅₀ (μM)
8		1,26
9		0,11
10		0,22
11		4,07

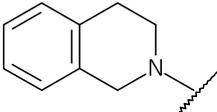
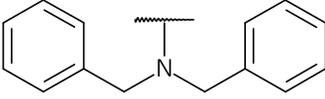
12		0,34
13		9,55

Tabella 2 - Derivati disulfidici e relative IC₅₀

Sebbene i numerosi studi sulla farmacologia, il preciso meccanismo inibitorio rimane ancora molto ambiguo; infatti ci sono studi che sostengono che **8** possa espletare la sua azione solo dopo metabolismo *in vivo* (53), mentre altri affermano che la molecola è comunque capace di legarsi a dei residui cisteinici dell'ALDH *in vitro*, con conseguente formazione di un ditiocarbamile instabile che porta poi ad un legame intramolecolare di tipo S-S tra due cisteine vicine (vedi Figura 12) (54).

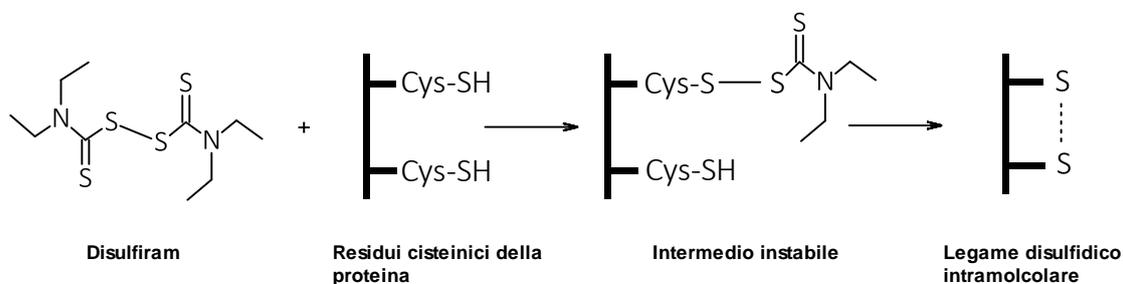


Figura 11 - Meccanismo d'azione del Disulfiram (8).

Proprio questo meccanismo è quello attribuito all'azione inibitoria dei derivati disulfidici sulla MAGL, in quanto i test *in vitro* sono stati effettuati su MAGL purificata, senza possibilità per **8** di essere metabolizzato in altri composti. L'irreversibilità è stata constatata mediante saggio di diluizione con veicolo dimetil-solfossido (DMSO); inoltre utilizzando il DTT, un riduttore di ponti disolfuro, l'attività dell'enzima viene ripristinata.

Utilizzando la tecnica della “mutagenesi sito specifica” (in cui una mutazione è creata in un particolare sito della molecola di DNA), si è capito che i target di queste molecole sono Cys208 e Cys242. Non sono ancora noti studi *in vivo* per valutare l’effetto sui livelli fisiologici di 2-AG ed eventuali comportamenti cannabinomimetici.

Derivati isotiazolinonici

Queste molecole derivano dall'isotiazolinone sostituito sull'N e sono stati caratterizzati come inibitori parzialmente reversibili della MAGL.

Il composto principale di questa serie è il 2-octil-isotiazol-3-one, anche detto octhilonone (**14**) (vedi figura 13); esso si è rivelato essere un inibitore solo parzialmente reversibile della MAGL ($IC_{50} = 88$ nM); la reversibilità è stata dimostrata mediante un saggio di diluizione (con veicolo DMSO al 2%), che ha ripristinato solo una parte delle funzioni basali dell'enzima (47).

Inoltre, aggiungendo una bassa concentrazione di DTT alla miscela di incubazione, formata da MAGL più octhilonone, si è osservato un notevole decremento (di circa 47 volte) della potenza inibitoria. Tale saggio dimostra l'interazione di **14** con i residui cisteinici dell'enzima.

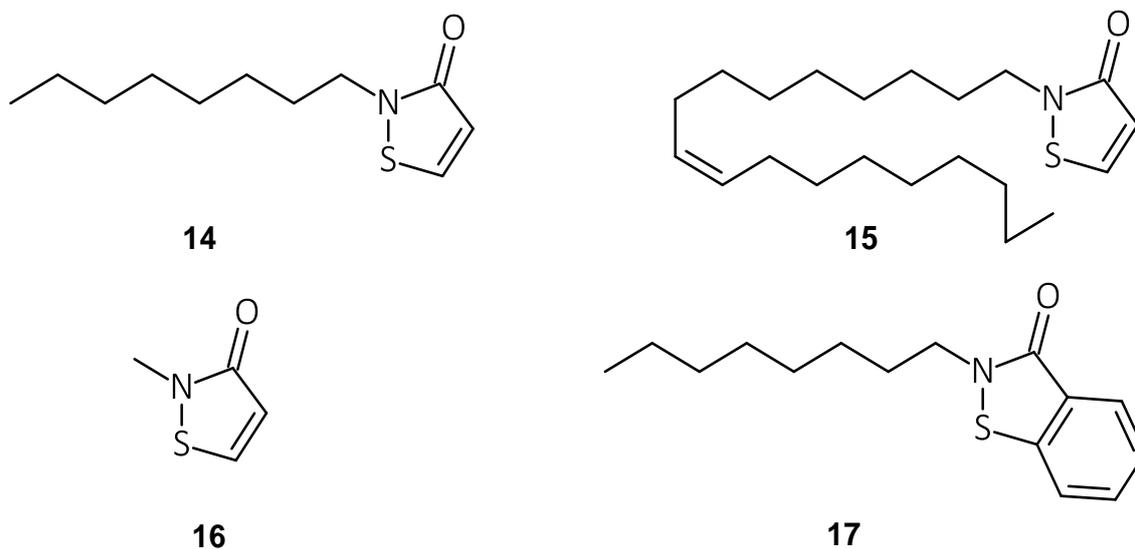


Figura 12 - Strutture chimiche dei derivati isotiazolinonici.

Sostituendo il gruppo N-octilico con un metile (composto **16**) (vedi Figura 13) la potenza inibitoria è notevolmente decresciuta ($IC_{50} = 239$ nM), al contrario, con l'introduzione sull'N di una catena lipofila più lunga, (gruppo oleico, composto **15**) (vedi Figura 13), è migliorata ($IC_{50} = 43$ nM); anche la sostituzione del nucleo isotiazolinonico con uno benzoisotiazolinonico (composto **17**) (vedi Figura 13) ha mostrato miglioramenti ($IC_{50} = 59$ nM). E' possibile notare una certa analogia con i derivati maleimmidici (vedi Tabella 1) in cui una lipoficità maggiore corrisponde ad un miglioramento dell'attività.

La prima ipotesi sull'interazione dei derivati isotiazolinonici con la MAGL si basava sull'addizione di Michael, vista la somiglianza con il nucleo maleimmidico: anche qui è presente un doppio legame apparentemente molto reattivo. Essa non è però compatibile con il ripristino dell'attività enzimatica dopo diluizione con DMSO, inoltre **17** non potrebbe dare addizione di Michael, in quanto ha tutti i doppi legami coinvolti nella formazione di un ciclo aromatico.

Da qui è scaturito che l'azione inibitoria di **14** e derivati è dovuta alla formazione di un legame disolfuro tra l'azoto endociclico e uno o più residui cisteinici della MAGL (vedi Figura 14); questo legame può essere ridotto (da agenti riducenti come il DTT) per ridare l'enzima libero.

La mutazione sistematica di tutte le cisteine note ha permesso di individuare la Cys208 come residuo coinvolto nel meccanismo d'azione di questa classe.

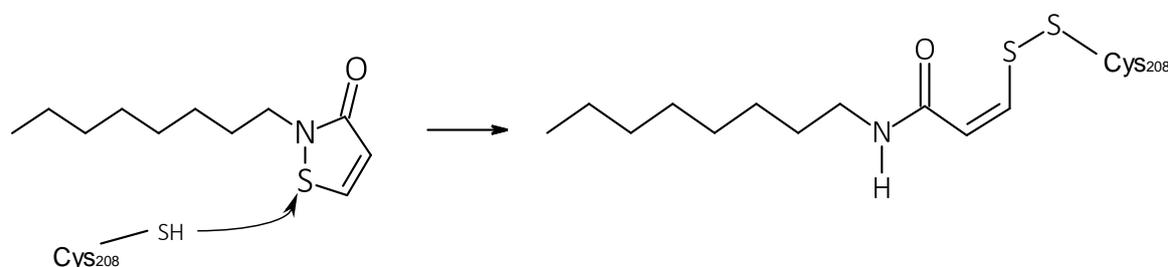


Figura 13 - Meccanismo d'azione dell'octhilinone (**14**).

Come per i derivati disulfidici, anche in questo caso non sono riportati studi rivolti a chiarire meglio gli effetti fisiologici e secondari sulla MAGL *in vivo*.

Inibitori covalenti della serina nucleofila

Come già specificato la MAGL appartiene alle serina idrolasi, una delle più vaste famiglie di enzimi contenenti un sito attivo costituito da una triade catalitica Ser-His-Asp.

La triade gioca un ruolo essenziale nella scissione del substrato; mentre nella sequenza genica i tre residui amminoacidici risiedono distanti l'uno dall'altro, nella struttura tridimensionale, a causa delle ripiegature, sono molto vicini.

La serina possiede un gruppo idrossilico che, di per sé, non è molto nucleofilo; a renderlo tale concorrono gli altri due residui.

L'ossidrile della Ser122 cede un protone all'His269; a tenere in quella posizione specifica il residuo di istidina (e nella corretta tautomeria) è l'Asp239. Oltretutto l'Asp239 permette di neutralizzare in parte, poiché in forma ionizzata, la carica positiva che ha acquistato l'istidina accettando un protone. L'ossigeno della serina, che ha perso un protone, è ora carico negativamente e attacca il carbonio del carbonile del legame bersaglio, formando un intermedio tetraedrico.

La successiva cessione del protone acquisito scinde il legame peptidico, liberando dal sito attivo la porzione amminoacidica della proteina bersaglio, mentre la serina resta legata al carbonile su cui ha operato l'attacco nucleofilo. Tale legame viene rotto con l'entrata nel sito attivo di una molecola d'acqua: un idrogeno viene ceduto dall'acqua all'istidina, mentre l'ossidrile nucleofilo attacca nuovamente il carbonile liberando la porzione carbossilica della proteina e rigenerando la Ser122 (vedi Figura 15).

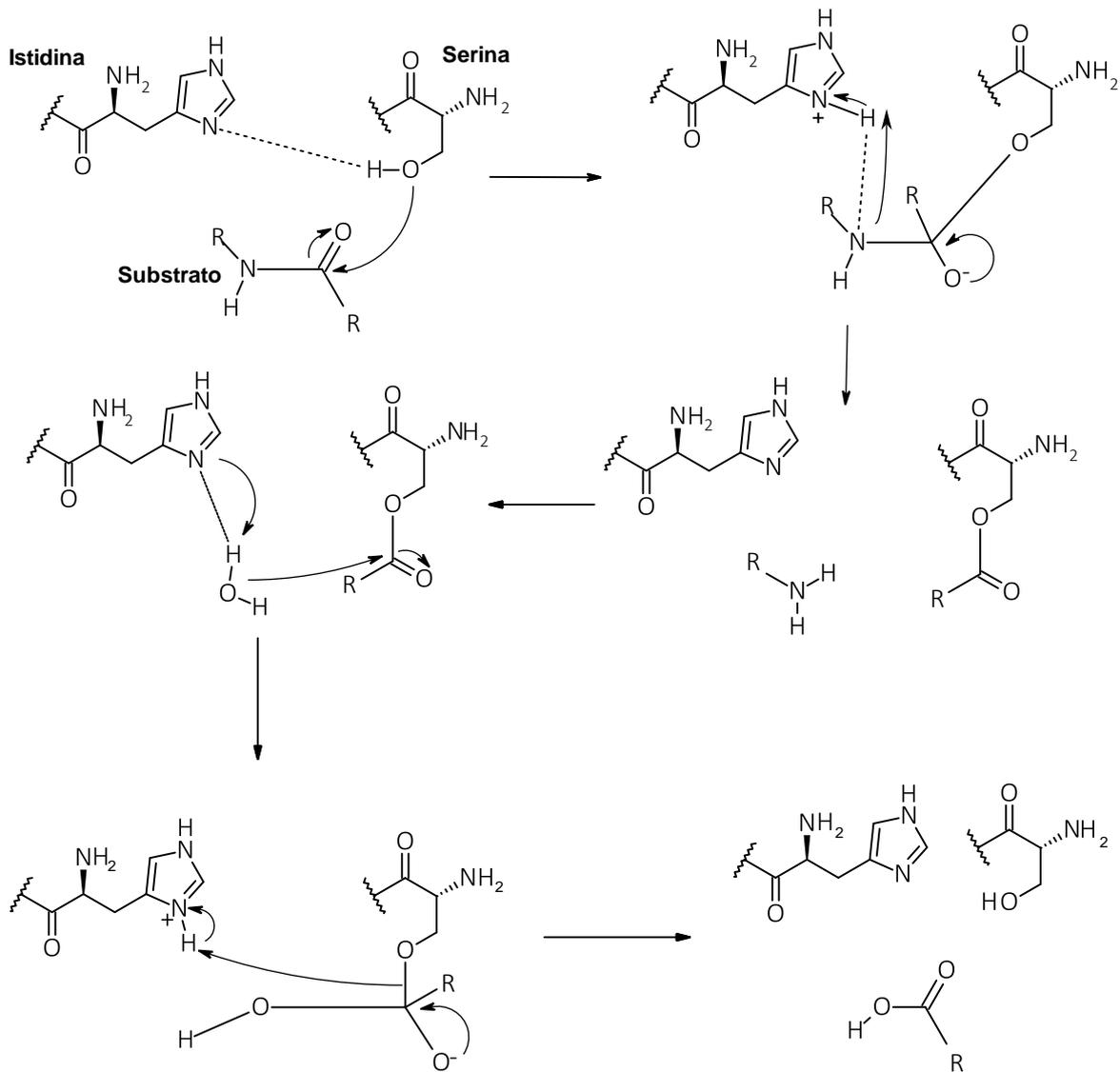


Figura 14 - Schematizzazione del processo idrolitico attuato dagli enzimi della famiglia delle α/β idrolasi (il residuo aspartico non è rappresentato).

Gli inibitori che hanno come target la triade catalitica e, più in particolare, il residuo di serina agiscono proprio come appena riportato.

Data l'importanza del residuo di Ser122 nel meccanismo idrolitico, sono stati testati numerosi ligandi capaci di legare covalentemente tale residuo. Lo scaffold di queste molecole è quello carbammico che porta ad una carbamidazione dell'ossidrilica della Ser122, ma sono stati ipotizzati anche meccanismi d'azione differenti, ancora da chiarire.

Derivati carbammici: da inibitori della FAAH ad una maggiore selettività verso la MAGL

Lo scaffold carbammico è caratteristico di alcuni composti studiati e classificati come inibitori selettivi della FAAH, come l'URB597 (**18**) e l'URB524 (**19**) (vedi Figura 16); questi contengono un ingombrante e rigido gruppo difenilico sull'ossigeno carbammico che sarebbe in grado di simulare la lunga e flessibile catena acilica dell'AEA.

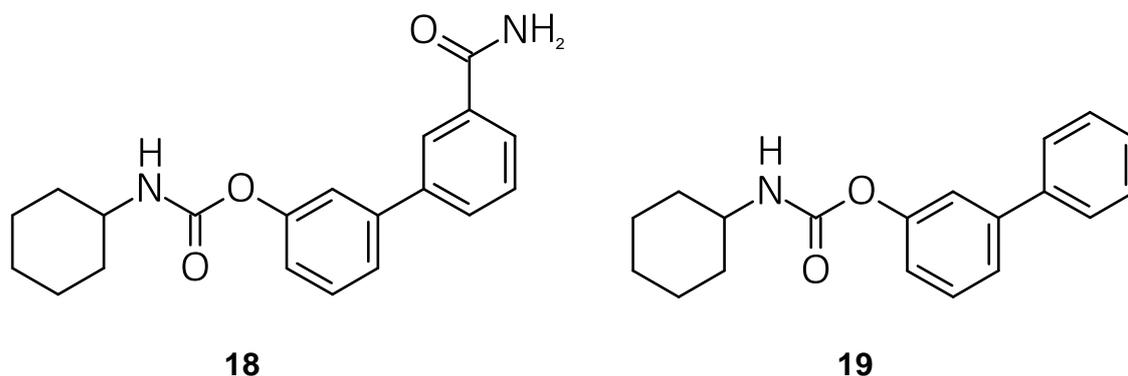


Figura 15 - Strutture chimiche di URB597 (**18**) e URB524 (**19**).

Questi due carbammati O-difenilici hanno dimostrato di inibire l'enzima FAAH senza andare ad alterare le funzioni della MAGL (55). Invertendo semplicemente i sostituenti su azoto e ossigeno di **19**, si ottiene l'URB602 (**20**) (vedi Figura 17), risultato essere un inibitore selettivo della MAGL senza avere alcuna influenza sulla FAAH (56).

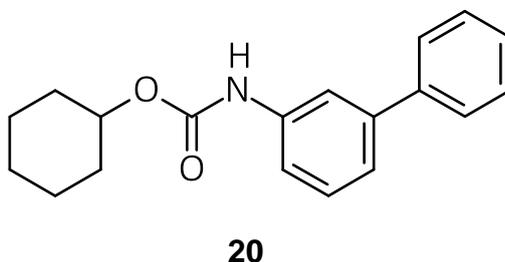


Figura 16 - Struttura chimica di URB602 (**20**).

I valori di IC₅₀ di **20**, derivati da test eseguiti *in vitro*, su tessuti encefalici di ratto e su MAGL ricombinata, sono di 28 µM e 223 µM, rispettivamente; questi valori indicano una limitata potenza inibitoria.

Queste molecole sono state studiate per confermare la partecipazione del sistema endocannabinoide nel fenomeno detto “analgesia indotta da stress” (SIA) non dipendente dal sistema oppioide in cui, in seguito ad uno stimolo nocivo eccessivo, l’organismo cerca di smorzare l’effetto dolorifico, aumentando i livelli di AEA e 2-AG; quindi la strategia di utilizzare inibitori delle idrolasi per delle valutazioni appare ovvia.

I risultati hanno mostrato come **20** migliori la SIA, senza che gli effetti siano annullati da antagonisti oppioidi.

Una dose somministrata *in vivo* pari a 20 mg/kg ha evocato effetti cannabinomimetici, quali catalessia, ipotermia ed ipomotilità; questi non sono stati riscontrati invece alla dose di 10 mg/kg.

E’ stato, quindi, usato questo dosaggio per via sistemica verso cavie che avevano ricevuto un’iniezione intraplantare di carragenina che induce una reazione infiammatoria acuta della zampa, con comparsa dei classici segni cardinali di infiammazione: l’edema, l’iperalgia e l’eritema.

URB602 (**20**) ha attenuato questi segni, sia in regime preventivo (somministrazione 30 minuti prima dello stimolo nocivo) che terapeutico (30 minuti dopo lo stimolo); l’attenuazione è stata annullata esclusivamente dalla somministrazione di SR144528, un antagonista selettivo dei recettori CB-2, mentre quella di rimonabant, antagonista selettivo dei CB-1, non ha sortito alcun effetto contrastante, indicando come gli effetti dell’inibitori, indotti da URB602, siano mediati esclusivamente dai primi recettori nominati.

Il meccanismo d’azione accertato per **18** consiste in una carbamidazione della serina sul sito attivo dell’enzima FAAH che porta alla formazione di un legame irreversibile (57). Si

pensa che anche **20** possa agire in maniera analoga (vedi Figura 18), ma è possibile che il meccanismo sia di tipo parzialmente reversibile, in quanto effettuando una dialisi a freddo per 24 ore l'effetto inibitorio è stato parzialmente annullato (58).

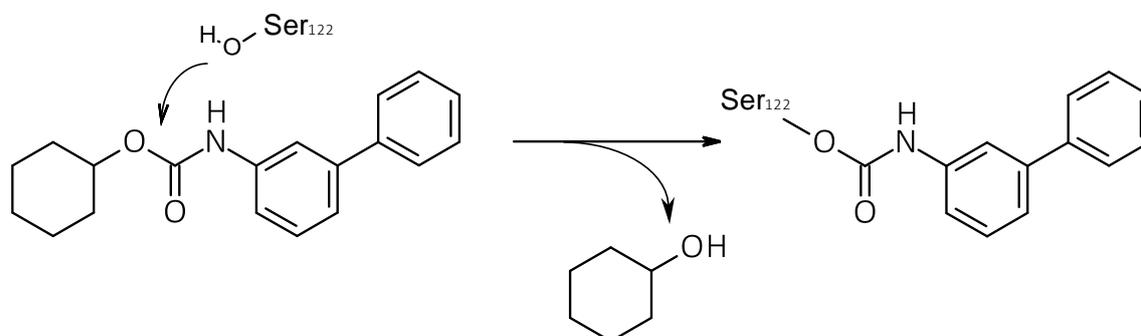
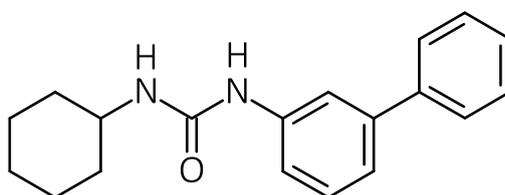


Figura 17 - Meccanismo d'azione di URB602 (**20**).

Gli studi SAR sono stati effettuati valutando la potenza inibitoria verso MAGL pura ricombinata da parte dei vari analoghi di **20** con differenti modifiche o alla porzione *O*-sostituita, o alla porzione *N*-sostituita o ad entrambe. Tutti hanno mostrato minore attività rispetto al composto di riferimento.

Un solo analogo (composto **21**) (vedi Figura 19), in cui lo scaffold carbammico è stato modificato ad urea, ha presentato un IC₅₀ di 115 μM, migliore di quello di URB602 (che, come riportato in precedenza, verso MAGL ricombinata ha un IC₅₀= 223 μM).



21

Figura 18 - Struttura chimica del derivato ureidico di URB602 (**21**).

Dato che **21** è stericamente assai simile a **20** ma non ha tendenza a dare legami covalenti con residui serinici, è possibile che l'inibizione derivi da un'interazione in un punto diverso del sito attivo.

CAY10499: un nuovo meccanismo d'azione su cui investigare

La molecola CAY10499 (**22**) (vedi Figura 20) è stata scoperta durante test su MAGL, inizialmente volti all'identificazione di substrati alternativi al 2-AG e 2-OG per i test *in vitro*. Questo nuovo approccio si basa sull'utilizzo del 4-nitrofenilacetato (4-NPA) come substrato idrolizzabile dalla MAGL; la sua buona attività come substrato è stata confermata testando i noti valori di IC₅₀ di composti come l'URB602 e il Disulfiram, che sono risultati congruenti a quelli dei relativi studi (59).

Le molecole oggetto di questo studio comprendevano una serie di carbammati, idantoine ed alcuni FANS; oltre a **22** anche il composto SC17 (**23**) (Vedi Figura 20) ha mostrato avere attività inibitoria verso la MAGL, mentre tutti gli altri composti testati sono risultati inattivi.

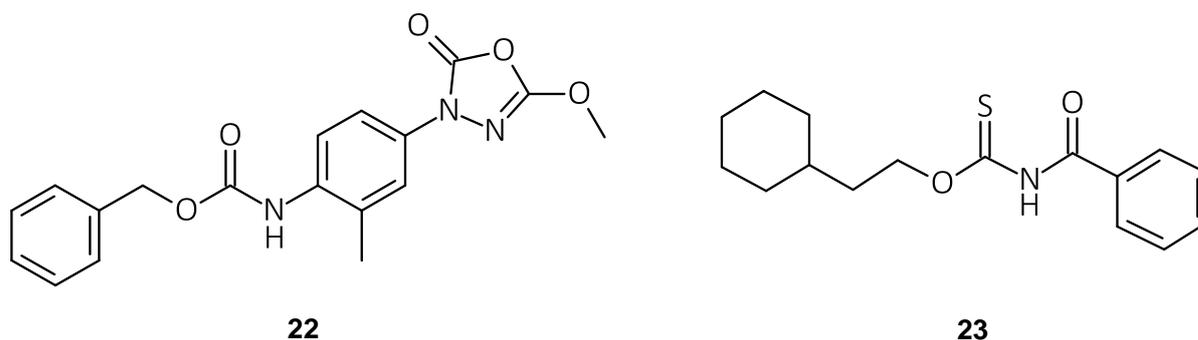


Figura 19 - Strutture chimiche di CAY10499 (**22**) ed SC17 (**23**).

Lo scaffold di **22** è quello carbammico, come nel caso di **20**, con un gruppo benzilico sull'ossigeno ed un gruppo 5-metossi-3-(3-fenossifenil)-1,3,4-ossadiazol-2(3H)-one sull'azoto; il composto **23** è invece un tiocarbammato.

I valore di IC₅₀, riportati tramite test *in vitro* effettuati su omogenato di tessuto encefalico di ratto, è di 0,5 μ M e di 5 μ M, per **22** e **23**, rispettivamente. Continuando la caratterizzazione di **22**, questo composto è risultato mancare di selettività verso le altre serina idrolasi, come nel caso della FAAH che viene inibita con un IC₅₀ pari a 0,076 μ M ed

è inoltre affine ai recettori CB-1 e CB-2 per il 25%. Mancano purtroppo ulteriori caratterizzazioni riguardanti **23**.

Gli altri composti testati insieme a **22**, pur essendo carbammati, non mostrano alcuna attività inibitoria nei confronti della MAGL; per questo motivo è stato ipotizzato che il meccanismo d'azione di questa molecola non riguardasse la carbamidazione del residuo di serina mediante l'attacco del gruppo carbamidico, bensì mediante l'apertura dell'anello ossadiazolonico (vedi Figura 21) (60).

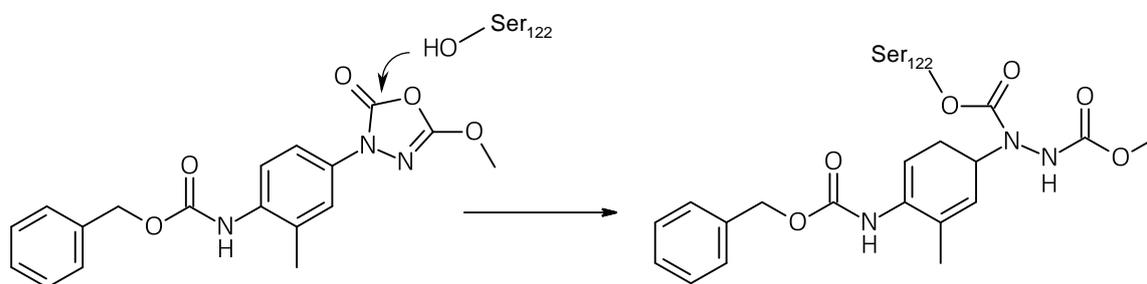
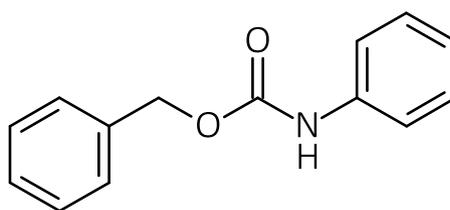


Figura 20 - Meccanismo d'azione di CAY10499 (**22**)

La conferma è stata ottenuta testando un derivato, il composto SC23 (**24**) (vedi Figura 22), in cui questa porzione è assente e non mostra alcuna attività inibitoria verso la MAGL.



24

Figura 22 - Struttura chimica di SC23 (**24**)

Di sicuro l'originale meccanismo d'azione di **22**, combinato alla sua notevole inibizione della MAGL, necessiterebbe maggiori approfondimenti per lo sviluppo di ulteriori inibitori sempre più selettivi ed efficaci.

JZL184 come inibitore selettivo della MAGL

La scoperta di questa molecola è avvenuta grazie alla tecnica di profiling proteico basato sull'attività (ABPP), che utilizza sonde chimiche per marcare una specifica classe di enzimi; nel caso delle serine idrolasi, come la MAGL, si utilizzano fluorofosfonati (61).

Essendo noto che il gruppo carbammico fosse in grado di legare covalentemente il sito attivo delle serine idrolasi, gli studi di screening hanno segnalato altri derivati di questo tipo, portando alla scoperta del JZL184 (**25**) (vedi Figura 23), un potente inibitore selettivo della MAGL.

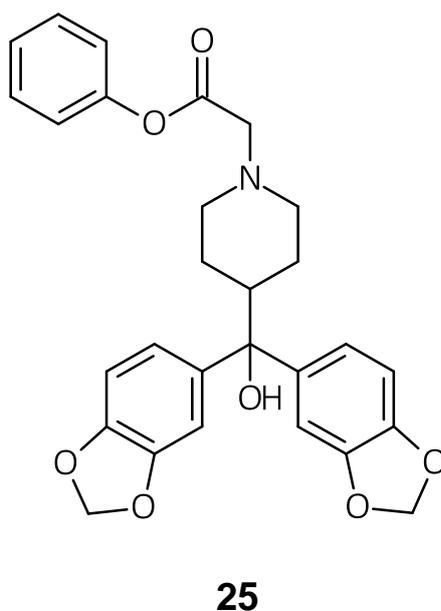


Figura 23 - Struttura chimica del JZL184 (**25**)

L'IC₅₀ per raggiungere il quasi completo blocco della MAGL, durante test *in vitro* su tessuto cellulare di membrana encefalica murina, è di 50 nM, molto minore se paragonata a quella del carbammato **20**. Inoltre l'inibizione di altre serine idrolasi, come FAAH ed ABHD6, non si verifica se non a concentrazioni superiori a 10 µM.

Curiosamente è possibile anche notare un residuo di attività idrolitica (circa il 15%) del 2-AG, nel tessuto trattato con dosi molto alte di **25**, ulteriore segno di selettività.

Non si verificano interazioni con i componenti del sistema endocannabinoide, né con i recettori CB-1 né con i CB-2, e nemmeno con gli enzimi deputati alla sintesi del 2-AG quali diacilglicerolo lipasi α e β o con gli enzimi citosolici mobilitanti l'acido arachidonico come la fosfolipasi A_2 .

Somministrando *in vivo* una dose di **25** minima, pari a 4 mg/kg, si riscontra una inibizione della MAGL del 75%, ma anche altre idrolasi come la FAAH risultano inibite per un buon 20%; portando la dose a 16 mg/kg, la residua attività idrolitica del 2-AG passa dal 25% al 15% e la FAAH è inibita in maniera dose dipendente, anche se la sua attività rimane per un buon 35%.

Per quanto riguarda invece i livelli di 2-AG nel cervello, alla dose minima (4 mg/kg) questi vengono incrementati di 5 volte, mentre alla massima (40 mg/kg) di 10 volte; non si sono riscontrate variazioni nei livelli di altri substrati della MAGL come mono-palmitoilglicerolo e il mono-oleoilglicerolo, come nemmeno di AEA.

Recenti tecniche di ABPP, associate a spettrometria di massa (una tecnica utilizzata per separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti), hanno etichettato degli off-target nel tessuto polmonare, ossia: esterasi-1 e triacilglicerol-idrolasi-2 (62).

Si verifica anche la comparsa di effetti fisiologici derivanti dall'attivazione del sistema endocannabinoide quali, analgesia, ipomotilità ed ipotermia, ma non catalessia; il fatto che questi effetti non si manifestino nelle cavie CB1 knock-out indica che sono mediati proprio dal recettore CB1.

Curiosamente **25** possiede una selettività simile verso gli orologi di MAGL umana e murina verso cui è molto potente; al contrario risulta essere molto meno potente verso l'orologio di ratto.

Il meccanismo d'azione, derivante da studi di cromatografia liquida-spettrometria di massa (Il cromatografo separa i composti presenti nel campione mentre lo spettrometro di massa funziona da rivelatore), prevede la carbamidazione del residuo serinico del sito attivo, in accordo con il classico meccanismo inibitorio del gruppo carbammico verso le serine idrolasi (vedi Figura 24).

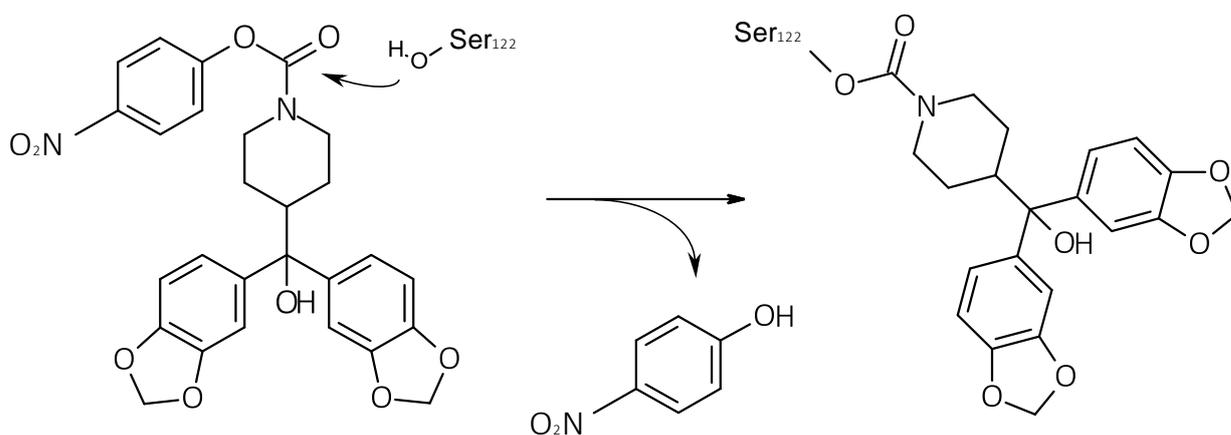


Figura 24 - Meccanismo d'azione di JZL184 (25)

Esafluoroisopropanolo come gruppo uscente per una migliore selettività: composto KML29

Dopo la scoperta e la valutazione di **25** il passo successivo è stato quello di cercare di migliorare la sua selettività, di per sé comunque buona, per la MAGL nei confronti della FAAH.

Si è cercato di sostituire il gruppo uscente *p*-nitrofenolo con un'altro sistema elettrofilo che potesse meglio discriminare tra le due idrolasi; è stato scelto il gruppo isofluoroisopropanolo in quanto possiede un basso valore di pK_a ed una struttura che assomiglia molto a quella del 2-AG. Dal composto **25** si è così ottenuto il composto KML29 (**26**) (vedi Figura 25) (63).

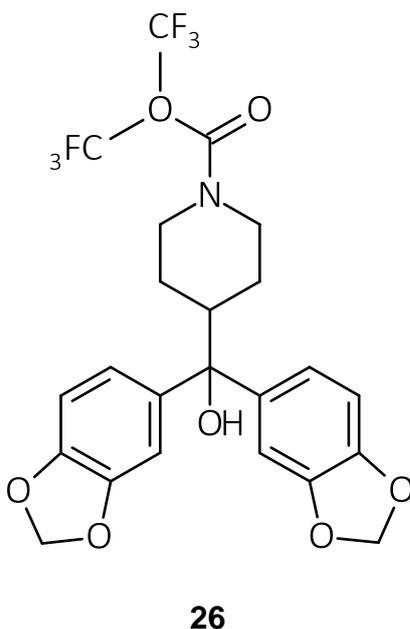


Figura 25 - Struttura chimica di KML29 (**26**)

Questo composto, durante i test *in vitro* su proteoma encefalico murino, è risultato inibire selettivamente la MAGL senza interferire minimamente con la FAAH e mostrando una

selettività maggiore di 100 volte sull'ABHD6, a tutte le concentrazioni testate (da 0,001 μ M a 50 μ M).

Tutte queste migliorie sulla selettività sono avvenute senza ritorsioni sulla potenza, in quanto **25** e **26** possiedono gli stessi valori di IC₅₀ verso la MAGL.

I test *in vivo* sono stati eseguiti su topi C57BI/6 trattati con somministrazioni di diverse dosi, in un range da 1 a 40 mg/kg di **25** e del suo derivato esafluoroisopropil sostituito.

Essi hanno mostrato un comparabile effetto inibitorio dose-dipendente sull'attività della MAGL nell'encefalo, con una parziale inibizione a 5 mg/kg ed una massima a 20 mg/kg; in accordo con i test *in vitro*, alla massima dose (40 mg/kg) **25**, inibisce parzialmente la FAAH, mentre **26** conserva la sua selettività.

Oltre alla reattività nei confronti della FAAH, **25** è risultato interferire anche con varie carbossilesterasi di fegato, polmoni e milza; il suo derivato invece non mostra questa mancanza di selettività, se non per un singolo enzima di circa 70 kDa, probabilmente corrispondente ad una carbossilesterasi (ES-1) che si trova abbondantemente nel plasma.

La MAGL di ratto è risultata essere inibita con grande specificità e selettività, ma solo con potenza leggermente minore, infatti alla massima dose l'idrolisi è bloccata per circa il 90%.

Questo indica un grande passo avanti per chiarire meglio il ruolo fisiologico della MAGL nel ratto, obiettivo non facilmente raggiungibile con gli inibitori precedenti.

Il meccanismo d'azione è analogo a quello di **25** (vedi Figura 24).

Triazoluree piperaziniche/piperidiniche come inibitori ultra-potenti ed altamente selettivi della MAGL

La struttura cristallografica della MAGL è stata riportata nel 2010 da Sanofi-Aventis, in seguito a precipitazione con l'inibitore covalente SAR629 (**27**) (Vedi Figura 26) (64).

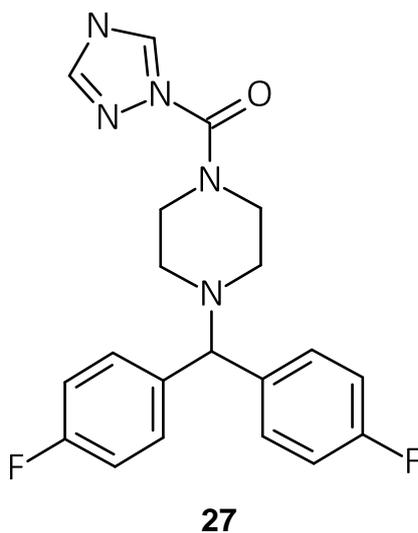


Figura 26 - Struttura chimica di SAR629 (**27**)

Il team che ha eseguito questa ricostruzione ha solo riportato che **27** fosse in grado di inibire la MAGL a concentrazioni nanomolari, senza fornire dei dati che sostenessero questa affermazione.

Per questo motivo altre equipe scientifiche hanno sintetizzato **27** ed altri derivati piperazinici che, insieme, hanno costituito la serie AKU (vedi Tabella 3) (65).

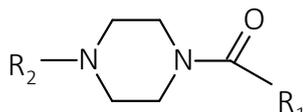
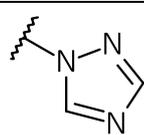
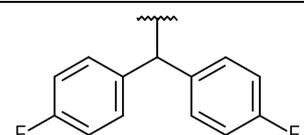
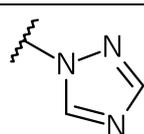
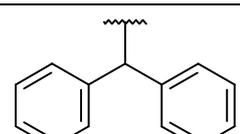
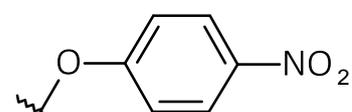
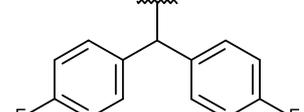
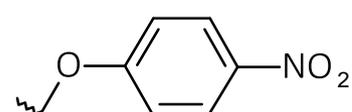
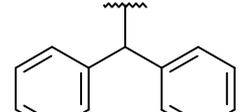
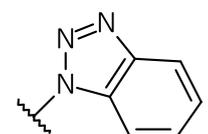
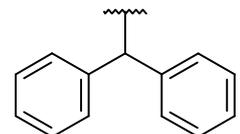
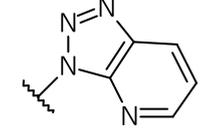
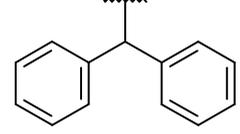
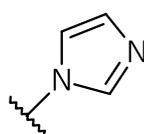
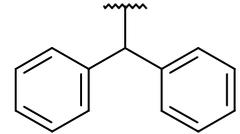
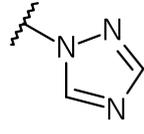
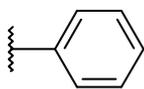
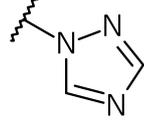
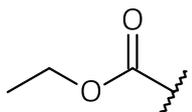
				
#	Nome	R ₁	R ₂	MAGL, IC ₅₀ (nM)
27	SAR629			0,219
28	AKU-005			0,309
29	AKU-015			282
30	AKU-003			316
31	AKU-006			1,9
32	AKU-002			0,759
33	AKU-004			2600
34	AKU-010			68
35	AKU-034			380

Tabella 3 - Derivati piperazini della serie AKU.

I valori di IC_{50} sono stati valutati in base a test *in vitro* verso enzima murino.

Come si può notare **27** e il suo stretto analogo strutturale AKU-005 (**28**) hanno un potere inibitorio su MAGL con un IC_{50} pari a 0,219 nM e 0,309 nM.

Sostituendo la porzione triazolica di **27** e **28** e rimpiazzandola con quella *p*-nitrofenossilica di **25**, si ottengono i composti AKU-015 (**29**) e AKU-003 (**30**); la potenza di questi derivati è di oltre 1000 volte inferiore rispetto a **25**, con IC_{50} di 282 nM e 316 nM, rispettivamente.

Rimpiazzando invece il triazolo con benzotriazolo, nel composto AKU-006 (**31**) o con triazolopiridina, nel composto AKU-002 (**32**) si riscontra un calo di potenza non molto marcato, dalle 2 alle 7 volte inferiore rispetto all'analogo triazolico.

La sostituzione del triazolo con un imidazolo, in AKU-004 (**31**) risulta in una drammatica caduta di potenza di circa 10000 volte rispetto a **27**.

Per quanto riguarda invece il sostituente aromatico ingombrante in posizione 4 alla piperazina, sostituendolo con un semplice fenile, nel caso del composto AKU-010 (**34**), la potenza inibitoria cala di circa 300 volte, mentre la sostituzione con un gruppo etossicarbonilico, come nel composto AKU-034 (**35**), mostra una potenza inferiore di circa 1500 volte rispetto a **27**.

Questi risultati indicano chiaramente che i derivati, che hanno il gruppo uscente costituito dal gruppo triazolico, benzotriazolico e triazolopiridinico, mostrano una potenza maggiore rispetto a quelli che hanno, nella stessa posizione, il gruppo *p*-nitrofenossilico; infine, nel caso dell'imidazolo, questo è chiaramente un pessimo gruppo uscente.

Appare chiaro che il sostituente aromatico, in posizione 4 all'anello piperazinico, determina l'alta selettività dei composti rispetto alle altre idrolasi. Oltre alla notevole potenza, i composti **27** e **28** hanno una preferenza per la MAGL di circa 100 volte maggiore rispetto a quella per la FAAH. Quindi per creare degli inibitori che fossero ultra potenti, ma anche altamente selettivi, si sono combinati insieme in un'unica molecola la

porzione triazolica con l'ingombrantissimo sostituente aromatico e l'anello piperazinico di **23**.

L'obiettivo iniziale di questo esperimento è stato quello di rimpiazzare il gruppo *p*-nitrofenossilico di **23** con un triazolo; tuttavia durante il processo di sintesi, l'idrossile alcolico terziario viene facilmente eliminato, quindi i composti ottenuti sono stati il derivato metilenico e il rispettivo idrogenato: stiamo parlando degli inibitori di nuova generazione ultra potenti ed altamente selettivi JKK-046 (**36**) e JKK-048 (**37**) (vedi figura 27).

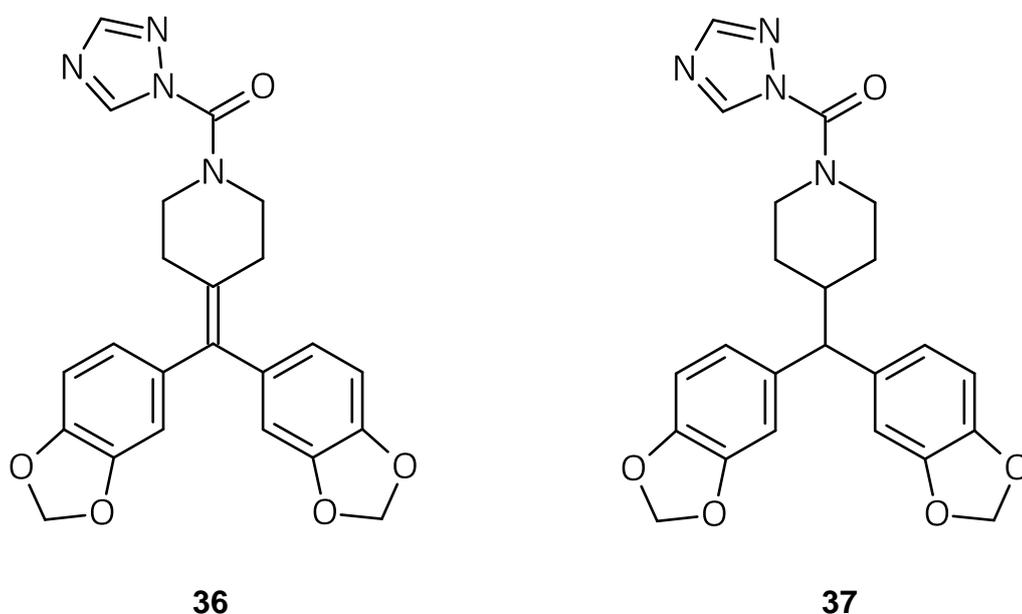


Figura 27- Strutture chimiche di JKK-046 (**36**) e di JKK-048 (**37**)

I test *in vitro*, sempre eseguiti su enzima murino, hanno mostrato valori di IC₅₀ pari a 0,191 nM per **36** e 0,275 nM per **37** ed una selettività maggiore per la MAGL, rispetto alla FAAH, di 1200 e 13000 volte, rispettivamente. Verso la MAGL umana invece l'IC₅₀ di **36** è di 0,562 nM, mentre quello di **37** è di 0,363 nM.

L'unico off-target riportato è relativo alla serina idrolasi ABHD6, probabilmente perché questa ha un'entrata al sito attivo molto simile a quella della MAGL; purtroppo non è disponibile una struttura cristallografica di ABHD6 per poter ottenere informazioni più dettagliate.

Purtroppo non sono disponibili studi *in vivo* relativi a questi inibitori ultrapotenti di nuovissima generazione.

Il meccanismo d'azione prevede che il gruppo triazolico, come già specificato, funga da gruppo uscente portando alla formazione di un addotto carbammato a livello del residuo Ser₁₂₂ (vedi Figura 28).

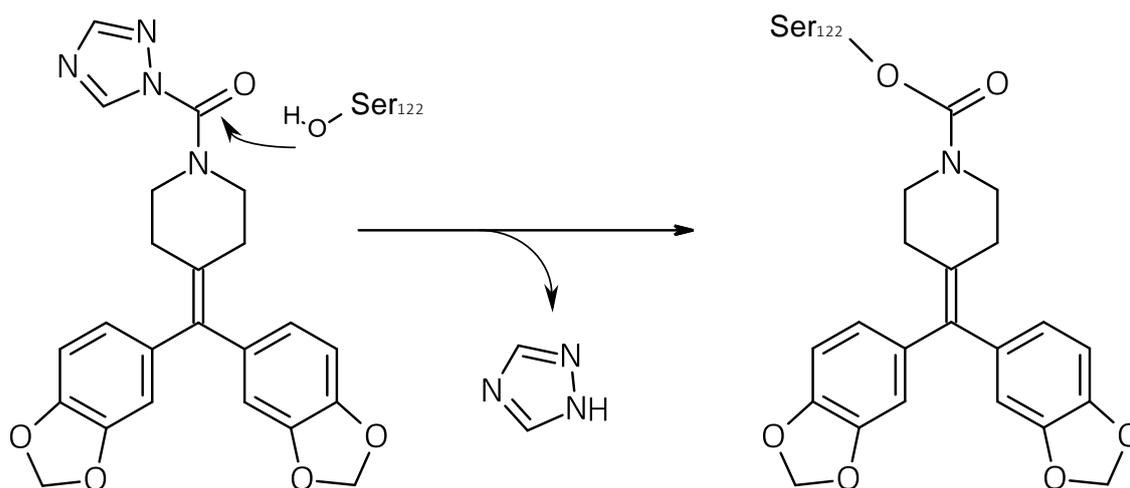


Figura 28 - Meccanismo d'azione di JJK-046 (36).

Conclusioni:

Come visto nei capitoli introduttivi, il progresso scientifico ha permesso di caratterizzare sempre meglio il ruolo dell'enzima MAGL; la disponibilità attuale di una struttura cristallografica e le tecniche di docking (un metodo usato per predire l'orientamento del legame di una piccola molecola farmacologicamente attiva alla sua proteina bersaglio) sono la combinazione perfetta per un ulteriore sviluppo di inibitori sempre più selettivi (66). Uno tra gli inibitori sopra riportati, il composto **25**, è stato oggetto di diversi studi e sperimentazioni, complementari a quelli di screening, per valutare gli effetti dell'inibizione della MAGL in determinate casistiche. Il blocco irreversibile provocato da **25** ha dimostrato di poter ridurre *in vitro* la proliferazione in linee cellulari cancerose prostatiche PC₃ (molto utilizzate nel campo della ricerca) (67), di inibire *in vivo* le sensazioni nocicettive provocate dalla costrizione del nervo sciatico e di esercitare effetti protettivi in cavie con emorragie gastriche provocate da FANS (68). Ricordiamo inoltre i risultati positivi ottenuti dall'inibizione della MAGL nel trattamento di cavie affette da ansia (42) e da sintomi di astinenza da sostanze quali la nicotina (45).

Gli ultimi cinque anni sono stati connotati da un'importantissima svolta dovuta all'ottenimento di cavie con gene MAGL knock-out, ossia non espresso geneticamente; questo è stato un grande passo avanti nella ricerca che ha permesso di poter studiare le reali conseguenze di un'inibizione cronica dell'enzima, come quella ottenibile con somministrazioni ripetute di inibitori covalenti.

All'inizio le preoccupazioni maggiori su un possibile utilizzo farmacologico degli inibitori MAGL erano rappresentate dall'insorgere a basse dosi di effetti indesiderati tipici della diretta stimolazione recettoriale cannabinoide, quali ipotermia e ipomotilità, che ne avrebbe di sicuro limitato l'uso in un ipotetico ambito clinico.

Con l'introduzione delle cavie MAGL knock-out è stato successivamente notato che l'effetto negativo più determinante è la desensibilizzazione dei recettori CB1; i roditori analizzati mostrano infatti una soglia del dolore molto simile a quella del wild-type, ma le sensazioni dolorose sono molto più accentuate nei topi knock-out (24). Questa situazione di iperalgesia è comunque contrastabile somministrando Rimonabant, a dimostrazione che è provocata proprio dalla perdita dei segnali mediati dal recettore CB1.

Dato che anche la somministrazione in regime ripetuto di **25** a topi C57BL/6N ha portato ad una situazione tale a quella riscontrabile nei topi knock-out, appare chiaro che un uso prolungato degli inibitori covalenti, a dosi che provocano la quasi totale inibizione della MAGL, non ha alcun effetto pro-analgésico, ma porta ad un'esacerbazione di alcuni tipi particolari di dolore, come quello a componente tonica (dolore di lunga durata provato anche molto tempo dopo la stimolazione dolorosa) (24).

Nonostante questa scoperta negativa non bisogna considerare infondato lo sviluppo degli inibitori covalenti della MAGL; essi sono stati, infatti, dei biomarker fondamentali per comprendere il ruolo che tale enzima riveste in vari processi.

Non è detto però che il loro uso clinico possa venire escluso a priori: va menzionato infatti uno studio *in vivo* in cui la somministrazione di una dose minima (4 mg/kg) di **25**, in regime continuativo di sei giorni, non ha mostrato alcun segno di desensibilizzazione recettoriale (69). Questo particolare è molto importante, in quanto potrebbe consentire agli inibitori covalenti di poter essere utilizzati a scopo terapeutico, senza creare scombinate del sistema endocannabinoide. Sarebbero necessari ulteriori studi di valutazione, ossia continuare la somministrazione della dose minima di **25** per un periodo superiore a sei giorni, per appurare che la desensibilizzazione recettoriale non avvenga e provare anche a contrastare la progressiva perdita dei segnali endocannabinoidi, testando una terapia combinata di inibitore covalente più antagonisti CB1/CB2.

Infine c'è da dire che un'ipotetica terapia valida ed accertata, a base di inibitori MAGL, rivolta al trattamento di malattie neurodegenerative (Parkinson e Alzheimer), alla disintossicazione da sostanze d'abuso e all'inibizione della crescita tumorale, farebbe senz'altro passare in secondo piano la perdita dei segnali mediati dagli endocannabinoidi.

Il nuovo campo di indagine per l'inibizione della MAGL si sta focalizzando sull'interazione di molecole non covalenti, che prevedano l'instaurarsi di un'interazione reversibile; attualmente il numero di molecole con queste caratteristiche è veramente ridotto. Una molecola molto promettente è ad esempio il terpenoide naturale Pristimerin (**38**), estratto da diverse piante appartenenti alle specie *Celastrus* e *Maytenus*, che ha mostrato un IC_{50} verso l'enzima purificato pari a 93 nM (70) ed una comprovata azione antitumorale in particolari tipi di cancro al seno, tanto da essere stato considerato valutabile come agente chemioterapico (71). Altri risultati promettenti sono arrivati dall'Università di Pisa, dove è stato eseguito il primo studio di screening virtuale, volto alla scoperta di nuovi inibitori reversibili della MAGL, che ha portato all'identificazione del composto (4-(4-clorobenzoil)piperidin-1-yl)(4-metossifenil) metanone, denominato CL6a (**39**), con un IC_{50} pari a 11,7 μ M, che potrebbe costituire un ottimo punto di riferimento per lo sviluppo di nuove molecole sempre più efficaci *in vivo* (72).

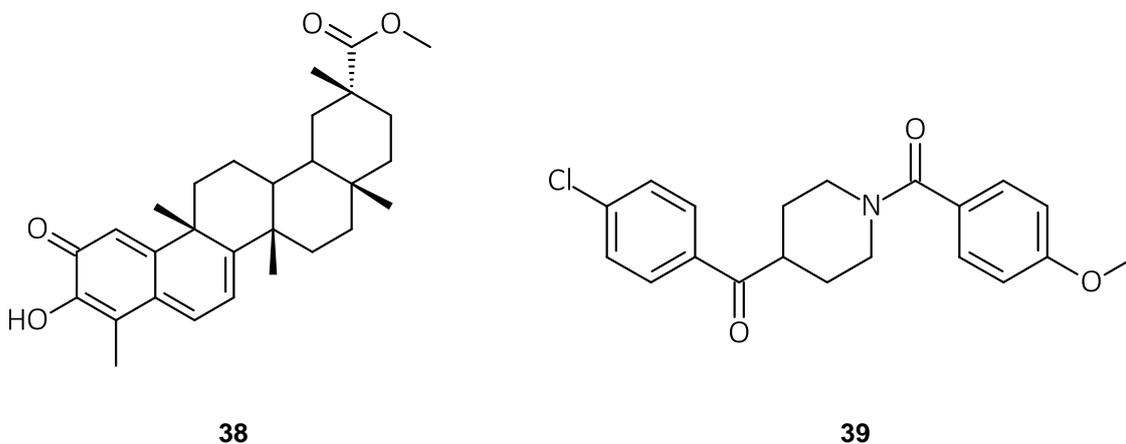


Figura 21 - Strutture chimiche di Pristimerin (**38**) e CL6a (**39**)

Dal momento che l'instaurazione di un legame reversibile è una condizione meno critica di quella derivante da uno irreversibile, questo sarà sicuramente un promettente campo di ricerca nei prossimi anni.

Bibliografia

1. *Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish.* **Gaoni, Y. e Mechoulam, R.** 1964, J. Am. Chem. Soc., Vol. 86.
2. *Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.* **Matsuda, L. A., et al.,** 1990, Nature, Vol. 346.
3. *Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.* **Munro, S., Thomas, K. L. e Abu Shaar, M.** 1993 : s.n., Nature, Vol. 365.
4. *Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission.* **Kano, M., et al.,** 2009, Physiol. Rev., Vol. 89.
5. *The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy.* **Pacher, P., Batkai, S. e Kunos, G.** 2006, Pharmacol. Rev., Vol. 58.
6. *Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.* **Devan, W. A., et al.,** 1992, Scienze, Vol. 258.
7. *2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain.* **Sugiura, T., et al.,** 1995, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 215.
8. *Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors.* **Mechoulam, R., et al.,** 1995, Biochem. Pharmacol., Vol. 50.
9. *Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.* **Cravatt, B. F., et al.,** 1996, Nature, Vol. 384.
10. *The endogenous cannabinoid receptor agonist anandamide impairs memory in rats.* **Mallet, P. E. e Beninger, R. J.** 1996, Behavioural Pharmacology, Vol. 7.
11. *Endocannabinoid hedonic hotspot for sensory pleasure: anandamide in nucleus accumbens shell enhances 'liking' of a sweet reward.* **Mahler, S.V., Smith, K. S. e Berridge, K. C.** 2007, Neuropsychopharmacology , Vol. 32.
12. *2-Arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor agonist: identification as one of the major species of monoacylglycerols in various rat tissues, and evidence for its generation through Ca²⁺-dependent and -independent mechanisms.* **Kondo, S., et al., et al.** 1998, FEBS Letters, Vol. 29.
13. *Endocannabinoids and food intake: newborn suckling and appetite regulation in adulthood.* **Fride, E., Bregman, T. e Kirkham, T. C.** 2005 : s.n., Experimental Biology and Medicine, Vol. 230.
14. *Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase activities in adipose tissue.* **Vaughan, M., Berger, J. E. e Steinberg, D.** 1964, J. Biol. Chem., Vol. 39.

15. *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.* **Zimmermann, R., et al.,** 2004, *Science*, Vol. 306.
16. *Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue.* **Tornqvist, H. e Belfrage, P.** 1976, *J. Biol. Chem.*, Vol. 251.
17. *cDNA cloning, tissue distribution, and identification of the catalytic triad of monoglyceride lipase. Evolutionary relationship to esterases, lysophospholipases, and haloperoxidases.* **Karlsson, M., et al.,** 1997, *J. Biol. Chem.*, Vol. 272.
18. *Influence of the degree of unsaturation of the acyl side chain upon the interaction of analogues of 1-arachidonoylglycerol with monoacylglycerol lipase and fatty acid amide hydrolase.* **Vandevoorde, S., et al.,** 2005, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 337.
19. *Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation.* **Dinh, T. P., et al.,** 2002, *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.*, Vol. 99.
20. *A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol.* **Blankman, J. L., Simon, G. M. e Cravatt, B. F.** 2007, *Chem. Biol.*, Vol. 14.
21. *Segregation of two endocannabinoid hydrolyzing enzymes into pre- and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala.* **Gulyas, A. I., et al.,** 2004, *Eur. J. Neurosci.*, Vol. 20.
22. *Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism.* **Long, J. Z., Nomura, D. K. e Cravatt, B. F.** 2009, *Chem. Biol.*, Vol. 16.
23. *Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation.* **Nomura, D. K., et al.,** 2011b, *Science*, Vol. 334.
24. *Augmented tonic pain-related behavior in knockout mice lacking monoacylglycerol lipase, a major degrading enzyme for the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol.* **Petrenko, A. B., Yamazakib, M. e Sakimurab, K.** 2014, Elsevier B.V., Vol. 271.
25. *Monoacylglycerol lipase exerts dual control over endocannabinoid and fatty acid pathways to support prostate cancer.* **Nomura, D. K., et al.,** 2011a, *Chem. Biol.*, Vol. 18.
26. *Exon-intron organization and chromosomal localization of the mouse monoglyceride lipase gene.* **Karlsson, M., et al.,** 2001, *Gene*, Vol. 272.
27. *Crystal structure of the human monoacylglycerol lipase, a key actor in endocannabinoid signaling.* **Labar, G., et al.,** 2010, *Chembiochem.*, Vol. 11.
28. *Structural investigation of the cofactor-free chloroperoxidases.* **Hofmann, B., et al., et al.** 1998, *J. Mol. Biol.*, Vol. 279.

29. *Therapeutic potential of monoacylglycerol lipase inhibitors.* **Mulvihill, M. M. e Nomura, D. K.** 2013, Life Sciences, Vol. 92.
30. *The glycerophospho metabolome and its influence on amino acid homeostasis revealed by brain metabolomics of GDE1(-/-) mice.* **Kopp, F., et al.,** 2010, Chem. Biol., Vol. 17.
31. *G-protein-coupled receptors and cancer.* **Dorsam, R. T. e Gutkind, J. S.** 2007, Nat. Rev. Cancer, Vol. 7.
32. *A New Age for MAGL.* **Guzman, M.** 2010, Chemistry & Biology.
33. *Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis.* **Nomura, D. K., et al.,** 2010, Cell, Vol. 140.
34. *A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists.* **V., Di Marzo.** 2006, Trends Pharmacol Sci, Vol. 27.
35. *Anti-inflammatory agents: present and future.* **Dinarello, C. A.** 2010, Cell, Vol. 140.
36. *Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain.* **Guindon, J., et al.,** 2011, Br. J. Pharmacol., Vol. 163.
37. *Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptorindependent.* **Garcia-Arencibia, M., et al.,** 2007, Brain Res, Vol. 1134.
38. *The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats.* **Reksidler, A. B., et al.,** 2007, Eur. J. Pharmacol., Vol. 560.
39. *Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation.* **Ramirez, B. G., et al.,** 2005, J. Neurosc., Vol. 25.
40. *Cyclooxygenase-1 null mice show reduced neuroinflammation in response to beta-amyloid.* **Choi, S. H. e Bosetti, F.** 2009, Aging-U.S., Vol. 1.
41. *Reversible gating of endocannabinoid plasticity in the amygdala by chronic stress: a potential role for monoacylglycerol lipase inhibition in the prevention of stress-induced behavioral adaptation.* **Sumislawski, J. J., Ramikie, T. S. e Patel, S.** 2011, Neuropsychopharmacology, Vol. 36.
42. *Inhibition of endocannabinoid catabolic enzymes elicits anxiolytic-like effects in the marble burying assay.* **Kinsey, S. G., et al.,** 2011c, Pharmacol. Biochem. Behav., Vol. 98.
43. *Blockade of endocannabinoid hydrolytic enzymes attenuates precipitated opioid withdrawal symptoms in mice.* **Ramesh, D., et al.,** 2011, J. Pharmacol. Exp. Ther., Vol. 339.

44. *The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol mediates D1 and D2 receptor cooperative enhancement of rat nucleus accumbens core neuron firing.* **Seif, T., et al.,** 2001, Neuroscience, Vol. 193.
45. *Inhibition of monoacylglycerol lipase enzyme reduces nicotine withdrawal.* **Muldoona, P. P., et al.,** 2014, Br. J. Pharmacol., Vol. 10.
46. *Refined homology model of monoacylglycerol lipase: toward a selective inhibitor.* **Bowman, A. L. e Makriyannis, A.** 2009, J. Comput. Aided Mol. Des., Vol. 23.
47. *A critical cysteine residue in monoacylglycerol lipase is targeted by a new class of isothiazolinone-based enzyme inhibitors.* **King, A. R., et al.,** 2009, Br. J. Pharmacol., Vol. 157.
48. *Subcellular localization and some properties of monoacylglycerol lipase in rat adipocytes.* **Sakurada, T. e Noma, A.** 1981, J. Biochem., Vol. 90.
49. *Characterization of the sulfhydrylsensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes.* **Saario, S. M., et al.,** 2005, Chem. Biol., Vol. 12.
50. *Synthesis and in Vitro Evaluation of N-Substituted Maleimide Derivatives as Selective Monoglyceride Lipase Inhibitors.* **Matuszak, N., et al.,** 2009, J. Med. Chem., Vol. 52.
51. *Disulfiram is an Inhibitor of Human Purified Monoacylglycerol Lipase, the Enzyme Regulating 2-Arachidonoylglycerol Signaling.* **Labar, G., et al.,** 2007, Chem BioChem, Vol. 8.
52. *Bis(dialkylaminethiocarbonyl)disulfides as Potent and Selective Monoglyceride Lipase Inhibitors.* **Kapanda, C., et al.,** 2009, J. Med. Chem., Vol. 52.
53. *Disulfiram metabolism as a requirement for the inhibition of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase.* **Yourick, J. J. e Faiman, M. D.** 1991, Biochemical Pharmacology, Vol. 42.
54. *Role of disulfiram in the in vitro inhibition of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase.* **Shen, M., Lipsky, J. e Naylor, S.** 2000, Biochemical Pharmacology, Vol. 60.
55. *Cyclohexylcarbamic acid 30- or 40 -substituted biphenyl-3-yl esters as fatty acid amide hydrolase inhibitors: synthesis, quantitative structure--activity relationships, and molecular modeling studies.* **Mor, M. et al.** 2004, J. Med. Chem., Vol. 47.
56. *An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia.* **Hohmann, A., et al.,** 2005, nature, Vol. 435.
57. *Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: implications for the design of covalent inhibitors and in vivo functional probes for enzymes.* **Alexander, J.P. and Cravatt, B.F.** 2005, Chem. Biol., Vol. 12.

58. *URB602 Inhibits Monoacylglycerol Lipase and Selectively Blocks 2-Arachidonoylglycerol Degradation in Intact Brain Slices.* **King, A. R., et al.**, 2007, *Chem. & Bio.*, Vol. 14.
59. *CAY10499, a novel monoglyceride lipase inhibitor evidenced by an expeditious MGL assay.* **Muccioli, G. G., Labar, G. e Lambert, D. M.** 2008, *Chembiochem.*, Vol. 9.
60. *Use of an Inhibitor To Identify Members of the Hormone-Sensitive Lipase Family.* **Ali, Y., et al.**, 2006, *Biochemistry*, Vol. 45.
61. *Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects.* **Long, J. Z., et al.**, 2009, *Nat. Chem. Biol.*, Vol. 5.
62. *Characterization of monoacylglycerol lipase inhibition reveals differences in central and peripheral endocannabinoid metabolism.* **Long, J. Z., Nomura, D. K. e Cravatt, B. F.** 2009, *Chem. Biol.*, Vol. 16.
63. *Highly Selective Inhibitors of Monoacylglycerol Lipase Bearing a Reactive Group that Is Bioisosteric with Endocannabinoid Substrates.* **Chang, J., et al.**, 2012, *Chem. & Bio.*, Vol. 19.
64. *Structural basis for human monoglyceride lipase inhibition.* **Bertrand, T., et al.**, 2010, *J. Mol. Biol.*, Vol. 396.
65. *Piperazine and Piperidine Triazole Ureas as Ultrapotent and Highly Selective Inhibitors of Monoacylglycerol Lipase.* **Aaltonen, N., et al.**, 2013, *Chem. & Bio.*, Vol. 20.
66. *A Review on the Monoacylglycerol Lipase: At the Interface Between Fat and Endocannabinoid Signalling.* **Labar, G., Wouters, J. and Lambert, D. M.** 2010, *Current Medicinal Chemistry*, Vol. 17.
67. *The influence of monoacylglycerol lipase inhibition upon the expression of epidermal growth factor receptor in human PC-3 prostate cancer cells.* **Cipriano, M., et al.**, 2014, *BMC Res Notes*, Vol. 7.
68. *Repeated low-dose administration of the monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 retains cannabinoid receptor type 1-mediated antinociceptive and gastroprotective effects.* **Kinsey, S. G., et al.**, 2013, *J Pharmacol Exp Ther*, Vol. 345.
69. *The monoa-cylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model.* **Ghosh, S., et al.**, 2013, *Life Sci.*, Vol. 92.
70. *Discovery of Potent and Reversible Monoacylglycerol Lipase Inhibitors.* **King, A. R., et al.**, 2009, *Chem Biol*, Vol. 16.
71. *Anticancer activity of pristimerin in epidermal growth factor receptor 2-positive SKBR3 human breast cancer cells.* **Lee, J. S., et al.** 2013, *Biol Pharm Bull*, Vol. 36.

72. *Identification and characterization of a new reversible MAGL inhibitor.* **Tuccinardi, T., et al.,** 2014, *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 22.